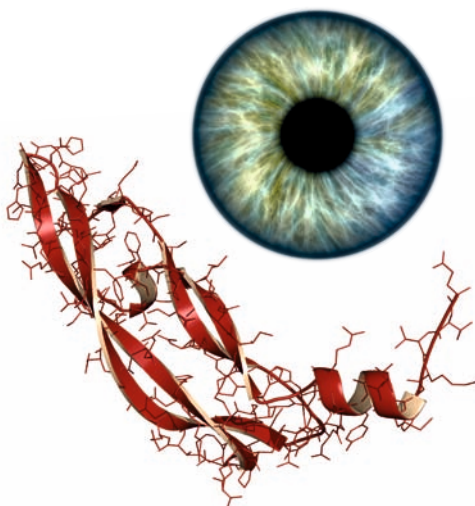


Zytokinanalyse bei Patienten mit altersabhängiger Makuladegeneration und bei Patienten mit diabetischem Makulaödem unter Anti-VEGF-Therapie

Ulrike Christina Viebahn



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2013

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2013

© 2013 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen

Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und Embryologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. med.vet. Dr. rer. medic. Stefan Arnhold

und

aus dem Zentrum für Augenheilkunde der Universitätsklinik Köln

Betreuer: Prof. Dr. med. Sascha Fauser

**Zytokinanalyse bei Patienten mit altersabhängiger
Makuladegeneration und bei Patienten mit diabetischem
Makulaödem unter Anti-VEGF-Therapie**

INAUGURAL DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Ulrike Christina Viebahn

Tierärztin aus Köln

Gießen 2013

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Stefan Arnhold

Prof. Dr. Sascha Fauser

Tag der Disputation: 19.11.2013

In memoriam Laika

Erklärung:

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Ulrike Viebahn

Köln/Gießen 2013

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	1
1. Einleitung	3
1.1 Anatomische Grundlagen	3
1.2 Altersabhängige Makuladegeneration	4
1.2.1 Epidemiologie.....	4
1.2.2 Formen der AMD und Risikofaktoren.....	4
1.2.3 Pathogenese	5
1.2.4 Klinische Symptome und Diagnose	7
1.2.5 Therapie	8
1.3 Diabetische Retinopathie und diabetisches Makulaödem	9
1.3.1 Epidemiologie.....	9
1.3.2 Formen der diabetischen Retinopathie und Risikofaktoren	9
1.3.3 Pathogenese	10
1.3.4 Klinische Symptome und Diagnose	10
1.3.5 Therapie	11
2. Ziel dieser Arbeit	11
3. Material und Methoden	13
3.1 Einschlusskriterien und Ausschlusskriterien.....	13
3.2 Diagnose und Behandlung.....	14
3.3 Messung von <i>vascular endothelial growth factor</i> und anderen Zytokinen	15
3.3.1 Gewinnung der Vorderkammer-Proben	15
3.3.2 Gewinnung der Blutproben	15
3.3.3 Messung der Proben	15
3.3.4 Patientendaten.....	19
3.3.5 Statistische Analyse.....	19
3.3.6 Verwendete Geräte und verwendetes Material.....	19
4. Ergebnisse	22
4.1 Altersabhängige Makuladegeneration	22
4.1.1 VEGF in Vorderkammerproben	22
4.1.2 VEGF in Vorderkammerproben in Langzeitbeobachtung.....	28
4.1.3 VEGF in Vorderkammer und Plasma.....	29
4.1.4 VEGF im Plasma unter Therapie.....	29
4.1.5 Andere Zytokine in Vorderkammerproben	30
4.1.6 Zytokine in Vorderkammerproben unter Therapie mit Ranibizumab	30
4.1.7 Zytokine im Plasma	31

4.2	Diabetisches Makulaödem.....	33
4.2.1	VEGF und andere Zytokine in Vorderkammerproben	33
4.2.2	VEGF und andere Zytokine in Vorderkammerproben unter Therapie.....	34
4.2.3	VEGF und andere Zytokine im Plasma	38
5.	Diskussion.....	39
5.1	Altersabhängige Makuladegeneration	39
5.1.1	VEGF in der Vorderkammer	39
5.1.2	VEGF im Plasma	43
5.1.3	Andere Zytokine in der Vorderkammer	45
5.1.4	Andere Zytokine im Plasma	55
5.2	Diabetisches Makulaödem.....	57
5.2.1	VEGF und andere Zytokine in der Vorderkammer	57
5.2.2	VEGF und andere Zytokine im Plasma	59
5.3	Ausblick in die Veterinärmedizin.....	60
6.	Schlussfolgerung	62
7.	Zusammenfassung	63
8.	Summary	65
	Literaturverzeichnis.....	67
	Tabellenverzeichnis	87
	Abbildungsverzeichnis	88
	Erklärung zur Vorabveröffentlichung von Ergebnissen	89

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
ANOVA	analysis of variance
AMD	altersabhängige Makuladegeneration
C5a	Komplementfaktor 5a
CFH	Komplementfaktor H
CNV	choroidale Neovaskularisation
CRP	C-reaktives Protein
DME	diabetisches Makulaödem (diabetic macular edema)
DRP	diabetische Retinopathie
ETDRS	early treatment diabetic retinopathy study
Fab	fragment antigen binding
FGF-a	fibroblast growth factor-acidic
g	Erdbeschleunigung
HIF-1 α	hypoxia-inducible-factor-1 α
iC3b	inactivated complement 3b
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
IFN- γ	Interferon- γ
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IRMA	intraretinale mikrovaskuläre Anomalien
K-EDTA	Kalium-Ethylendiamintetraacetat
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
MMP	Matrixmetalloproteinase
NVD	neovascularization of the disc
NVE	neovascularization elsewhere
PDT	Photodynamische Therapie
PDGF-AA	platelet-derived growth factor AA
PIGF	placental growth factor
ROS	reaktive Sauerstoffspezies

RPE	retinales Pigmentepithel
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SD-OCT	Spektral-Domänen-optische Kohärenztomographie
THBS-2	Thrombospondin-2
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
VEGF	vascular endothelial growth factor
VK	Vorderkammer

1. Einleitung

Unter den Augenerkrankungen nehmen die Erkrankungen der Netzhaut eine wichtige Stellung ein. Dabei können verschiedene Strukturen betroffen sein.

Die Netzhaut oder Retina ist eine Schicht von spezialisiertem Nervengewebe an der hinteren Innenseite des Auges von Wirbeltieren, die das auf das Auge auftreffende Licht in Nervenimpulse umwandelt. Diese Impulse werden in elektrische Signale umgewandelt und an das Gehirn weitergeleitet, wo schließlich das eigentliche Bild, das wir sehen, entsteht.

In der Mitte der Retina befindet sich die Stelle des schärfsten Sehens, der sogenannte gelbe Fleck oder die *Macula lutea*. Ist diese Region von einer Erkrankung betroffen, die zu einem Absterben der Zellen der Netzhaut führt, spricht man von einer Makuladegeneration.

Neben der juvenilen Form spielt die sogenannte altersabhängige Makuladegeneration (AMD) eine bedeutende Rolle. Sie ist die Hauptursache für Erblindungen bei älteren Menschen in den Industrienationen (Ambati u. a., 2003a). Da zu erwarten ist, dass im Rahmen des demographischen Wandels das Durchschnittsalter der Bevölkerung in diesen Ländern weiter steigen wird, wird vermutlich zukünftig AMD vermehrt diagnostiziert werden, sodass Erkennung, Prophylaxe, Entstehung und Therapie dieser Erkrankung an Bedeutung gewinnen werden.

Bei jüngeren Menschen hingegen ist die häufigste Ursache für eine Erblindung die diabetische Retinopathie (DRP), die eine Folge von Diabetes-mellitus-Erkrankungen darstellt. Ist der Punkt des schärfsten Sehens, die Makula, betroffen, spricht man von einer diabetischen Makulopathie, die zusätzlich mit einem Makulaödem einhergehen kann. Mit der zu erwartenden, durch die Lebensumstände bedingten Zunahme von Diabetes-mellitus-Erkrankungen in der westlichen Welt erscheint eine erfolgreiche Prävention bzw. Therapie der Folgeschäden, wie z.B. der diabetischen Retinopathie, immer wichtiger zu werden.

1.1 Anatomische Grundlagen

Die Retina grenzt zum Auginnenraum an den Glaskörper und ihre äußere Schicht bildet das retinale Pigmentepithel (RPE). Diesem schließt sich die Bruchsche Membran an. Es folgen Aderhaut (Chorioidea bzw. Choroidea) und schließlich die Lederhaut (Sklera), die äußere Augenhülle.

Die Retina besteht aus mehreren Schichten. In der äußeren Schicht (äußere Körnerschicht),

zur Choroidea hin, liegen die Photorezeptoren (Stäbchen für das Dämmerungssehen und Zapfen für das Tag- und Farbsehen), die mit ihren Rezeptoraußengliedern die Lichtreize aufnehmen. Das retinale Pigmentepithel versorgt sie dabei mit Nährstoffen und transportiert ihre Stoffwechselabbauprodukte zur Aderhaut. Die Signale werden schließlich durch bipolare Zellen, Horizontalzellen und amakrine Zellen (innere Körnerschicht) an die Ganglienzellen weitergegeben. Die Ganglienzellen liegen zum Glaskörper hin und leiten den Lichtimpuls über die Papille zum Sehnerven weiter. Die Papille selbst ist frei von Photorezeptoren, weshalb der sogenannte blinde Fleck im Gesichtsfeld entsteht. Temporal der Papille, im Zentrum der Retina, liegt die *Macula lutea*, die wegen der Pigmenteinlagerungen „gelber Fleck“ genannt wird. In der *Macula lutea* liegt die *Fovea centralis retinae*. Sie enthält nur Zapfen und stellt somit die Stelle des schärfsten Sehens dar (Grehn, 2008).

1.2 Altersabhängige Makuladegeneration

1.2.1 Epidemiologie

Die fortschreitende Degeneration der Makula in höherem Lebensalter, die sogenannte altersabhängige Makuladegeneration, ist die häufigste Erblindungsursache im Sinne des Gesetzes jenseits des 65. Lebensjahres (Ambati u.a., 2003a). Männer und Frauen sind in gleicher Weise betroffen, wobei die Ausprägung an beiden Augen unterschiedlich sein kann. Anhand europäischer Studien wird die Prävalenz von Spätformen der AMD bei 70-Jährigen auf 1,4% geschätzt, bei 80-Jährigen steigt sie auf 5,6% und bei 90-Jährigen liegt sie bei 20% (Rudnicka u. a., 2012). Man geht davon aus, dass allein 2006 ungefähr 4,5 Millionen Deutsche an AMD litten (Holz u. a., 2006). Schätzungen ergeben, dass die Zahl der Fälle von AMD-Neuerkrankungen von 5285 im Jahr 2010 auf 7340 im Jahr 2030 ansteigen wird, sodass 2030 die Inzidenzrate bei 9,5 Erkrankten pro 100.000 Personen liegt (Finger u. a., 2011).

1.2.2 Formen der AMD und Risikofaktoren

Die AMD kommt sowohl in der sogenannten trockenen als auch in der feuchten oder exsudativen Form vor. Bei der weitaus häufigeren (ca. 85%) trockenen Form kommt es durch Ablagerungen von Stoffwechselendprodukten, den sogenannten „Drusen“, zu Verschlechterungen im Stoffwechsel der Netzhaut und zu Veränderungen der Durchblutung

und Nervenfunktion. Dies führt zu Pigmentverschiebungen im Zentrum der Retina und schließlich zu einer Atrophie des Pigmentepithels und der sensorischen Netzhaut.

Bei der feuchten Form kommt es aufgrund von Defekten in der Bruchschens Membran und im Pigmentepithel zu Flüssigkeitsansammlungen unterhalb des Pigmentepithels und der Netzhaut. Es entstehen Ödeme mit Pigmentepithelabhebungen oder serösen Netzhautabhebungen. Pathologische choroidale Gefäße können durch Lücken im Pigmentepithel und in der Bruchschens Membran wachsen, man spricht von einer choroidalen Neovaskularisation (CNV). Diese neuen Gefäße neigen aufgrund ihres unzureichenden Wandaufbaus dazu, zu bluten und die Makula zu zerstören. Liegt die Gefäßneubildung unter dem Pigmentepithel, spricht man von einer okkulten CNV; ist sie durch das Pigmentepithel durchgebrochen und liegt somit im subretinalen Raum, spricht man von einer klassischen CNV. Im Spätstadium kann es zur Bildung einer fibrovaskulären Membran kommen (Grehn, 2008).

Die genauen Entstehungsmechanismen der altersabhängigen Makuladegeneration sind noch nicht abschließend geklärt. Es scheint sich um ein multifaktorielles Geschehen zu handeln, bei dem sowohl endogene als auch exogene Risikofaktoren eine Rolle spielen. Eine genetische Prädisposition wurde nachgewiesen (Dewan u. a., 2006; Haddad u. a., 2006; Klaver u. a., 1998; Meyers, 1994; Scholl u. a., 2005), außerdem begünstigt erhöhter Nikotingenuss, an einer AMD zu erkranken (Chakravarthy u. a., 2007; Vingerling u. a., 1996). Weitere Faktoren, wie zum Beispiel intensive Sonneneinstrahlung, Übergewicht, ethnische Zugehörigkeit und Irisfarbe werden als Krankheitsauslöser diskutiert (Frank u. a., 2000).

Bei genetischen Analysen von Patienten ist aufgefallen, dass ca. 50-70% der Betroffenen eine Veränderung am sogenannten CFH-Gen aufweisen. Es kodiert für die Proteinbiosynthese des Komplementfaktor H, der sich u.a. im retinalen Gewebe findet. Im alternativen Aktivierungsweg des Komplementsystems wirkt der Faktor H hemmend, sodass die komplementvermittelte Lyse verhindert wird. Fehlt nun, wie bei einigen Patienten beschrieben, dieser Faktor H, findet die Lyse von Photorezeptoren und RPE ungehemmt statt (Hageman u. a., 2005; Robert J. Klein u. a., 2005; N. Patel u. a., 2008).

1.2.3 Pathogenese

Die genauen Ursachen für die Entstehung einer AMD sind bislang nicht bekannt. Das retinale Pigmentepithel und seine Veränderungen im Alterungsprozess scheinen aber eine wichtige Rolle in der Pathogenese zu spielen. Im gesunden Auge phagozytieren die

Pigmentepithelzellen die verbrauchten Membranscheibchen der Rezeptoraußenglieder (Young, Bok, 1970). Die Scheibchen werden lysosomal abgebaut und die Abbauprodukte werden durch die Bruchsche Membran an die Choroidea zum Abtransport weitergeleitet. Das sogenannte „Alterspigment“ Lipofuszin, ein Teil des degenerierten Materials, das nicht weiter abgebaut werden kann, wird in den RPE-Zellen gespeichert (Boulton u. a., 1994). Mit zunehmendem Alter akkumuliert Lipofuszin und es kann zu Störungen im Abbauprozess kommen. Die Stoffwechselendprodukte können sich zwischen Basalmembran des RPE und Bruchscher Membran als sogenannte Drusen einlagern, die sich funduskopisch als gelblich-weiße Ablagerungen darstellen. Ihre genaue Entstehung und Zusammensetzung ist nicht abschließend geklärt. Sie enthalten u.a. verschiedene Proteine, Komplementfaktoren, Glykoproteine und RPE-Zellfragmente. Drusen gelten als erstes klinischen Anzeichen einer AMD, anhand ihres Auftretens und ihrer Struktur lassen sich verschiedene Stadien der Erkrankung festmachen (Bird u. a., 1995). Die Ablagerungen können eine Verdickung der Membran, eingeschränkte Permeabilität und verminderten Stoffaustausch zwischen RPE und Choroidea (Abdelsalam u. a., 1999) verursachen. Es kommt zur Degeneration und Atrophie des RPE. Die RPE-Insuffizienz führt zum Absterben der Photorezeptoren (trockene Form der AMD) (Fauser u. a., 2003). Große Drusen können zur Abhebung des RPE und zu Lücken und Spaltbildungen zwischen der Basalmembran des RPE und der inneren kollagenen Schicht der Bruchschen Membran führen, durch die schließlich Gefäße der Choroidea einwachsen können (Abdelsalam u. a., 1999).

Außerdem können die extrazellulären Ablagerungen lokale chronische Entzündungen induzieren. Sie locken dendritische Zellen an, die als Phagozyten und Immunzellen agieren. Dendritische Zellen, Makrophagen und RPE-Zellen sezernieren ihrerseits verschiedene Zytokine und angiogenetische Faktoren, sodass ein Entzündungsgeschehen aufrechterhalten wird (de Jong, 2006). Zusammen mit den oben erwähnten Vorgängen innerhalb des Komplementsystems scheint die AMD also auch eine entzündliche Komponente aufzuweisen. Durch die Um- und Abbauvorgänge im RPE und der Bruchschen Membran sowie durch eine zusätzliche altersbedingte Verdünnung der gefäßreichen Choroidea kommt es zu einer Hypoxie der Photorezeptoren (Ramrattan u. a., 1994). Diese Sauerstoffunterversorgung ist Reiz zur Bildung von VEGF, vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren, die die Bildung von Neovaskularisationen fördern und somit den Weg für die Entwicklung einer feuchten AMD ebnen (Mousa u. a., 1999).

Unter dem Begriff VEGF (*vascular endothelial growth factor*) wird eine Proteinfamilie von Wachstumsfaktoren zusammengefasst, zu der VEGF A bis F und der *placental growth factor*

(PlGF) zählen. VEGF spielt sowohl bei der Vaskulogenese als auch bei der Angiogenese eine wichtige Rolle. Viele Tumoren exprimieren zudem VEGF, da Neovaskularisationen in der Tumorgenese eine wichtige Rolle spielen (Jakeman u. a., 1993; Klagsbrun, D'Amore, 1996; Risau, 1994). Von VEGF-A wurden bislang neun Isoformen identifiziert, von denen die längeren zellständig sind (Takahashi, Shibuya, 2005). VEGF-A führt zur Mitose und Migration von vaskulären Endothelzellen, außerdem wirkt es chemotaktisch auf Makrophagen und Monozyten (Dias u. a., 2011). Außer an der Proliferation von Endothelzellen und der Verhinderung der Apoptose dieser Zellen ist VEGF-A an der Bildung von Gefäßlumina und der Verlängerung von Gefäßen beteiligt (Hoeben u. a., 2004). Darüber hinaus gilt es als Vasodilatator, indem es die Bildung von Stickstoffmonoxid beeinflusst (Valdes u. a., 2009). VEGF-A führt zu einer Erhöhung der vaskulären Permeabilität (Lal u. a., 2001), unter anderem durch die Lockerung der *tight junctions* der Endothelzellen (Wang u. a., 2001) und die Induzierung endothelialer Fenestrierung (Roberts, Palade, 1995), sodass Ödembildungen begünstigt werden. VEGF-B ist in der embryonalen Vaskulogenese involviert, VEGF-C und VEGF-D tragen zur Lymphangiogenese bei, VEGF-E wird von Viren kodiert und VEGF-F ist Bestandteil von Schlangengiften (Shibuya, 2011). Zu den auslösenden Faktoren für die Produktion von VEGF zählt die Hypoxie. Über die sogenannten hypoxieinduzierten Faktoren, beispielweise HIF-1 α , wird die Ausschüttung von VEGF bewirkt (Kinnunen u. a., 2012). VEGF bindet an seinen Rezeptor, eine Tyrosinkinase, wodurch das Signal ins Zellinnere weitergeleitet wird. Es sind bislang drei Rezeptoren bekannt (VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3), an die die verschiedenen VEGF-Formen mit unterschiedlicher Affinität binden. VEGF-A kann beispielsweise nur an VEGFR-1 und VEGFR-2 binden (Dias u. a., 2011; Shibuya, 2011). Wenn nicht anders angegeben, ist im Folgenden mit dem Ausdruck „VEGF“ VEGF-A gemeint.

1.2.4 Klinische Symptome und Diagnose

Patienten bemerken eine langsame Verschlechterung der Sehschärfe und der Lesefähigkeit. Bei der feuchten Form mit Makulaödem tritt oftmals ein plötzlicher Visusverlust auf, es kommt bei den Patienten zu Metamorphopsien (Verzerrtsehen), Mikro- oder Makropsie sowie zu einer Abnahme des Kontrastempfindens und des Farbsehens. Zentrale Gesichtsfeldausfälle treten auf. Die Diagnose der AMD wird durch die Funduskopie bei erweiterter Pupille gestellt. Eine Stadieneinteilung der AMD kann mit Hilfe der Fluoreszenzangiographie (FA) vorgenommen werden, eine Indocyanningrünangiographie kann weitere Informationen z.B. über choroidale Veränderungen liefern. Mit der optischen

Kohärenztomographie (OCT) können Schnittbilder des Augenhintergrundes in hoher Auflösung aufgenommen werden (Grehn, 2008).

1.2.5 Therapie

Für die trockene Form der AMD gibt es keine gesicherte Therapieoption. Neben der Verminderung der Risikofaktoren wie Nikotinabusus und Übergewicht wird generell eine Einnahme von speziellen Nahrungsergänzungsmitteln empfohlen (Ho u. a., 2011; van Leeuwen u. a., 2005). In der amerikanischen ARED-Studie (Age-related-eye-disease-Studie) wurden Hinweise gefunden, dass durch die hochdosierte Gabe von Mikronährstoffen und Antioxidantien (Vitamin C, Zink, Karotinoide) die Progression der Erkrankung reduziert werden kann. Daneben existieren noch einige zum Teil medikamentöse Therapieansätze, die sich aber alle noch im Entwicklungsstadium befinden (Damico u. a., 2012). Es wird beispielsweise versucht, den Sehzyklus so zu modulieren, dass die Anreicherung von Lipofuszin gemindert wird (Gerste, 2012). Ansonsten sind vergrößernde Sehhilfen ein wichtiges Hilfsmittel für Betroffene.

Bei der feuchten Form der AMD hat sich inzwischen die intravitreale Gabe von VEGF-Inhibitoren durchgesetzt. Durch die Herunterregulierung von VEGF sollen die pathologischen Neovaskularisationen im Auge unterbunden werden. VEGF-A gilt als potentestes proangiogenetisches Protein, das eine Hauptrolle in der Pathogenese der CNV spielt (Dias u. a., 2011; Kwak u. a., 2000). Das humanisierte, rekombinante, monoklonale Antikörperfragment Ranibizumab (Handelsname Lucentis[®], Hersteller Novartis) bindet mit erhöhter Affinität VEGF-A und ist offiziell zur Therapie der feuchten AMD seit 2007 in Deutschland zugelassen. Daneben wird Bevacizumab (Handelsname Avastin[®], Hersteller Roche), der komplette monoklonale Antikörper, der alle Isoformen von VEGF-A hemmt, im *off-label-use* zur Therapie eingesetzt. Ein gängiges Behandlungsschema in Deutschland, das auch am Zentrum für Augenheilkunde des Universitätsklinikums Köln angewendet wird, sieht wie folgt aus: Patienten mit feuchter AMD erhalten initial drei aufeinanderfolgende, monatliche intravitreale Injektionen von 0,5 mg Ranibizumab. Nach dieser Behandlungsserie erfolgen monatliche Kontrolluntersuchungen, bei der Spektral-Domänen Kohärenztomographie (SD-OCT)-Aufnahmen, ETDRS (*early treatment diabetic retinopathy study*)-Visus-Untersuchungen und Fundusbeurteilungen Aufschluss über den Therapiezustand des Patienten geben. Fluoreszenzangiographie und Indocyaningrünangiographie werden in unklaren Fällen angewendet. Flüssigkeit im OCT bzw. Leckagen in der Fluoreszenzangiographie, Visusverlust von fünf oder mehr Buchstaben oder neue intra- bzw.

subretinale Blutungen definieren hierbei ein Rezidiv bzw. eine Persistenz der CNV- Aktivität. Liegt ein Rezidiv oder eine Persistenz vor, erfolgt eine erneute Behandlung mit drei monatlichen intravitrealen Injektionen von Ranibizumab.

1.3 Diabetische Retinopathie und diabetisches Makulaödem

Komplikationen einer Diabetes-mellitus-Erkrankung stellen Vaskularisationsstörungen, sowohl in Form von Makro- als auch Mikroangiopathien, dar. Am Auge der Patienten manifestieren sich diese Folgeschäden als sogenannte diabetische Retinopathie (DRP). Ist dabei die Makula betroffen, sodass es zum fortschreitenden Verlust der zentralen Sehschärfe kommt, spricht man von einer diabetischen Makulopathie. Die Ursache hierfür kann ein durch die Gefäßschädigungen hervorgerufen Makulaödem sein.

1.3.1 Epidemiologie

Die diabetische Retinopathie ist die häufigste Erblindungsursache in der erwerbsfähigen Bevölkerung (20.-65. Lebensjahr) der Industrieländer. Sie ist die häufigste mikrovaskuläre Komplikation bei Diabetes mellitus. Nach 20 Jahren leiden an ihr ca. 90% der Diabetiker (Lang, 2004). Das diabetische Makulaödem (DME) ist die Hauptursache für einen zentralen Sehschärfeverlust bei Patienten mit diabetischer Retinopathie (Fraser-Bell u. a., 2008). In der “Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy” (WESDR, (Klein u. a., 1995) betrug die Inzidenz für DME über einen Zeitraum von zehn Jahren 20,1% für Patienten mit Typ-1-Diabetes und 25,4% für Patienten mit Typ-2-Diabetes mit Insulinbehandlung. Mit der steten Zunahme des Lebensdurchschnittsalters und der Verlagerung zu einer fett- und kohlehydratreichen Ernährung werden die Zahl der Diabetiker und auch die Erkrankungsfälle der diabetischen Retinopathie weltweit weiter zunehmen (Grehn, 2008). Nach Prognosen der WHO wird die Zahl der Neuerblindungen durch Diabetes in Deutschland von 1728 im Jahr 2010 auf 2171 im Jahr 2030 ansteigen (Knauer, Pfeiffer, 2006).

1.3.2 Formen der diabetischen Retinopathie und Risikofaktoren

Man teilt die DRP in die nichtproliferative diabetische Retinopathie und die proliferative diabetische Retinopathie ein.

Bei der nichtproliferativen diabetischen Retinopathie unterscheidet man je nach Anzahl der Mikroaneurysmen, Blutungen, Verdickungen der Venen und Schweregrad der intraretinalen mikrovaskulären Anomalien (IRMA) eine milde, mäßige und schwere Form.

Die proliferative diabetische Retinopathie ist durch Gefäßneubildungen gekennzeichnet. Liegen diese Neovaskularisationen an der Papille, spricht man von einer NVD (*neovascularization of the disc*), finden sie sich an anderer Stelle, beispielsweise an den großen Gefäßen, bezeichnet man dies als NVE (*neovascularization elsewhere*). Ist der Bereich der Makula in Mitleidenschaft gezogen worden, liegt eine diabetische Makulopathie vor. Es können Mikroaneurysmen, Punktblutungen und Lipidablagerungen („harte Exsudate“) festgestellt werden. Bei einer auftretenden Verdickung der Netzhaut im Bereich der Makula, dem Makulaödem, unterteilt man je nach Ausbreitung in ein diffuses und ein fokales Makulaödem. Von einem klinisch signifikanten Makulaödem, d.h. von einem visusbedrohenden Makulaödem, spricht man, wenn die Veränderungen ganz oder teilweise innerhalb eines Papillendurchmessers von der Foveola entfernt liegen (Hammes u. a., 2004). Liegt eine ischämische Komponente vor, sodass die Perfusion des Kapillarnetzes rund um die Fovea in ausgedehnten Bereichen zum Erliegen kommt, bezeichnet man dies als ischämische Makulopathie (Grehn, 2008).

Als Hauptrisikofaktor für die Entstehung einer diabetischen Retinopathie gilt die schlechte Blutzuckereinstellung. Weiterhin wirken sich arterielle Hypertonie und Nikotingenuss ungünstig auf den Verlauf aus (Eliasson, 2003; Kamoi u. a., 2013).

1.3.3 Pathogenese

Bei der diabetischen Retinopathie handelt es sich um eine Mikroangiopathie. Durch die Hyperglykämie im Rahmen der Diabetes-mellitus-Erkrankung kommt es zu Verdickungen der Basalmembranen der Gefäße, zu Perizytenverlust und einem Untergang von Gefäßendothelzellen. Kapillarverschlüsse und retinale Ischämie sind die Folge. Um die retinale Hypoxie auszugleichen, werden neue Gefäße gebildet. Dazu werden angiogene Faktoren, wie VEGF, gebildet. Die Gefäßpermeabilität nimmt zu, sodass es zu einem Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke kommen kann und ein Netzhautödem entstehen kann.

1.3.4 Klinische Symptome und Diagnose

Die Patienten bemerken oft erst im Spätstadium Symptome. Es stellen sich Sehverschlechterungen oder eine plötzliche Erblindung ein. Durch ein diabetisches Makulaödem kann es u.a. zu unscharfem oder verzerrtem Sehen und zu Sehproblemen in der Dunkelheit kommen. Liegt eine proliferative diabetische Retinopathie vor, wachsen zusammen mit den Neovaskularisationen fibrovaskuläre Membranen, die sich an den

Glaskörper legen und durch Kontraktionen eine Traktionsablatio herbeiführen können. Außerdem kann es zu plötzlichen Glaskörperblutungen kommen, da die Wände der neugebildeten Gefäße oft instabil sind. Dramatische Sehverschlechterungen sind die Folge. Schließlich können sich die neuen Gefäße auch an der Iris (*Rubeosis iridis*) und am Kammerwinkel bilden, sodass eine Erblindung durch ein sich entwickelndes sekundäres neovaskuläres Glaukom eintreten kann (Grehn, 2008). Ophthalmoskopisch können Blutungen, Mikroaneurysmen und harte Exsudate erkannt werden. Die Fluoreszenzangiographie lässt zwischen Aneurysmen und Blutungen unterscheiden und stellt CNV dar. Mittels OCT lassen sich letztere noch präziser abbilden, Ödeme können nachgewiesen werden.

1.3.5 Therapie

Generell sind regelmäßige Kontrolluntersuchungen beim Augenarzt wichtig, um frühzeitig Veränderungen festzustellen und gegebenenfalls entsprechende Therapiemaßnahmen einzuleiten. Bei fortgeschrittenen oder exsudativen Retinopathien besteht die Möglichkeit der Laserkoagulation. Bei Glaskörperblutungen und Netzhautablösung mit Membranbildung muss meist eine Entfernung des Glaskörpers, eine Vitrektomie, durchgeführt werden. Antiangiogenetische und entzündungshemmende Wirkung haben Glukokortikoide, die intravitreal verabreicht werden können und bei einem diabetischen Makulaödem zur Stabilisierung der Blut-Retina-Schranke und auch bei der proliferativen Form eingesetzt werden. Daneben sind die optimale Einstellung der Blutzuckerwerte, die Behandlung von Bluthochdruck, Hyperlipidämie und die Änderung des Lebensstil in Richtung mehr körperlicher Bewegung, Abbau von Übergewicht und Nikotinkarenz wichtige Bestandteile der Therapie. Erst seit dem Jahr 2011 ist der VEGF-Inhibitor Ranibizumab in Deutschland bzw. seit 2012 in den USA für die Behandlung des diabetischen Makulaödems zugelassen.

2. Ziel dieser Arbeit

Da die Pathogenese der AMD und des diabetischen Makulaödems sowie der genaue Wirkmechanismus von VEGF bzw. die Wirkweise von VEGF-Inhibitoren noch nicht abschließend geklärt ist, soll die Rolle von VEGF und anderen Zytokinen im Rahmen dieser Krankheitsgeschehen näher betrachtet werden. Es liegen zwar zahlreiche Untersuchungen zu Morphologie und Funktion der Retina unter Behandlung mit Ranibizumab vor, aber es gibt nur wenige Studien die das eigentliche Zielmolekül VEGF, also die Spiegel von VEGF im

Auge, untersucht haben. Diese Studien haben VEGF in Vorderkammerproben gemessen (Bakri u. a., 2007; Funk u. a., 2009). In der vorliegenden Arbeit sollen sowohl VEGF als auch andere pro- bzw. antiangiogenetische und entzündungsassoziierte Zytokine analysiert werden. Ziel dieser Arbeit ist es, zu untersuchen, welche Zytokine vor Beginn der Therapie mit intravitreal verabreichtem Ranibizumab im Kammerwasser der AMD- und DME-Patienten nachweisbar sind und wie sich die Zytokinspiegel im Therapieverlauf, vor allem in einer Langzeitbehandlung von bis zu drei Jahren, ändern. Außerdem soll erörtert werden, ob das Zytokinmilieu und der Therapieerfolg in Zusammenhang stehen. Alle Faktoren werden auch in Plasmaproben vor und während der Anti-VEGF-Behandlung analysiert, um die systemische Ebene der Krankheitsprozesse zu betrachten. Die Messwerte werden mit denen einer gesunden Kontrollgruppe, die sich einer Katarakt-Operation unterzog, verglichen. Die Frage, ob ein entzündliches Geschehen in der Pathogenese der AMD oder auch des DME eine Rolle spielt, soll erörtert werden.

3. Material und Methoden

Die vorliegende Arbeit ist Teil einer prospektiven Beobachtungsstudie, die am Zentrum für Augenheilkunde der Universitätsklinik Köln durchgeführt wird. Von allen Patienten liegen schriftliche Einverständniserklärungen vor. Das Protokoll wurde von der Ethikkommission der Universität zu Köln genehmigt (Referenznummer 11-027) und folgt den Grundsätzen der Deklaration von Helsinki. Diese Studie wurde bei ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01213667 registriert.

3.1 Einschlusskriterien und Ausschlusskriterien

Die AMD-Patienten, die in die Studie eingeschlossen wurden, wiesen eine aktive sub- oder juxtafoveale CNV als Folge der AMD auf; dies wurde durch eine Spektral-Domänen Kohärenztomographie und Fluoreszenzangiographie mit Indocyaningrün bestätigt. Zudem musste das Studienauge eine Sehschärfe mit bester Korrektur von ≥ 20 ETDRS Buchstaben aufweisen und es durfte zuvor keine Behandlung für exsudative AMD erhalten haben, wie z.B. photodynamische Therapie oder intravitreale Injektionen. Weitere Ausschlusskriterien waren ophthalmologische Operationen, ausgenommen Katarakt-Operationen.

In die Gruppe der Diabetiker wurden Patienten, bei denen eine Diabetes-mellitus-Erkrankung diagnostiziert wurde und die ein diabetisches Makulaödem (DME) aufwiesen, eingeschlossen. Die Feststellung des Ödems erfolgte mit Hilfe der Spektral-Domänen Kohärenztomographie und der Fluoreszenzangiographie mit Indocyaningrün. Zudem musste das Studienauge eine Sehschärfe mit bester Korrektur von ≥ 20 ETDRS Buchstaben aufweisen. Es durfte keine Vorbehandlung des DME, beispielsweise durch intravitreale Injektionen, vorgenommen worden sein. Zu den weiteren Ausschlusskriterien zählten ophthalmologische Operationen außer Katarakt-Operationen und systemische Erkrankungen, die nicht mit der Diabetes-mellitus-Erkrankung im Zusammenhang standen.

Für die Kontrollgruppe wurden Patienten, die sich einer Katarakt- oder Epiretinale-Gliose-Operation unterzogen, rekrutiert. AMD, DRP und schwerwiegende systemische Erkrankungen galten als Ausschlusskriterien.

3.2 Diagnose und Behandlung

Initial erhielten die AMD-Patienten drei aufeinanderfolgende, monatliche intravitreale Injektionen von 0,5 mg Ranibizumab (Lucentis®). Es schlossen sich monatliche Kontrolluntersuchungen an, in denen SD-OCT-Aufnahmen, Sehschärfetests (standardisiert nach ETDRS) und Fundusbeurteilungen durchgeführt wurden. Fluoreszenz- bzw. Indocyaningrünangiographie wurde nur bei unklaren Fällen durchgeführt. Wurde in der OCT Flüssigkeit oder bei der Fluoreszenzangiographie eine Leckage nachgewiesen oder wurde ein Verlust von ≥ 5 Buchstaben beim ETDRS-Visus bzw. neue intra- oder subretinale Blutung festgestellt, so wurde dies als Rezidiv oder Persistenz der CNV-Aktivität definiert. Im Falle eines Rezidivs bzw. einer Persistenz wurde eine erneute Serie von drei intravitrealen Injektionen mit Ranibizumab angeordnet. Da in Deutschland die Ranibizumab-Spritzen erst nach einem schriftlich gestellten Antrag bei der Krankenkasse genehmigt werden, kommt es bei jedem einzelnen Fall zu Verzögerungen zwischen der Indikationsstellung und der Behandlung. Durch die so entstandenen unterschiedlichen Intervalle zwischen den einzelnen Spritzen konnte die Suppressionsdauer von VEGF bestimmt werden.

Bei den diabetischen Patienten wurden als Initialbehandlung drei intravitreale Injektionen mit je 0,5 mg Ranibizumab im Abstand von je vier Wochen verabreicht. Nach einem Monat schloss sich eine Kontrolluntersuchung an, bei der unter Berücksichtigung der Befunde von Fundusuntersuchung, OCT, Fluoreszenzangiographie und des Visusverlaufs über eine Weiterbehandlung entschieden wurde. Eine Fortsetzung der Behandlung erfolgte bis zur Stabilisierung der Erkrankung, das bedeutet bis kein weiterer Visusanstieg oder kein Ödem mit fovealer Beteiligung in SD-OCT oder Fluoreszenzangiographie bei den letzten drei monatlichen Kontrollen mehr nachgewiesen werden konnte. Die Gabe von Ranibizumab wurde nach einer Unterbrechung wieder aufgenommen, wenn im Rahmen der monatlichen Untersuchungen Hinweise auf eine neue Aktivität festgestellt werden konnten. Kriterien hierfür waren die signifikante Zunahme des Makulaödems mit fovealer Beteiligung im OCT, die signifikante Zunahme der angiographischen Leckage im Bereich der Fovea sowie ein klinisch signifikanter Visusverlust (Behandlungsschema orientiert an der Stellungnahme der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft, der Retinologischen Gesellschaft und des Berufsverbandes der Augenärzte Deutschlands zur Therapie der Diabetischen Makulopathie, Stand Dezember 2010 (DOG u. a., 2011)).

3.3 Messung von *vascular endothelial growth factor* und anderen Zytokinen

3.3.1 Gewinnung der Vorderkammer-Proben

Vor jeder intravitrealen Injektion bzw. vor der eigentlichen Katarakt-Operation wurde dem Patienten mittels limbalen Parazentese mit einer 30-gauge Nadel, die auf eine Insulinspritze gesetzt wurde, 0,1 ml Vorderkammerflüssigkeit abgenommen. Die Probe wurde sofort bei -80 °C in einem sterilen Polypropylengefäß bis zur Analyse gelagert.

3.3.2 Gewinnung der Blutproben

Kurz vor dem Eingriff wurde dem Patienten venöses Blut mittels Butterflynadel und Monovette® (K-EDTA-Röhrchen, 2,7 ml) abgenommen, das Röhrchen wurde mehrmals behutsam geschwenkt. Innerhalb von 30 Minuten wurde das EDTA-Röhrchen in der Zentrifuge bei $1000 \times g$ für die Dauer von 10 Minuten und bei 4 °C zentrifugiert. Mittels steriler Einmalpipette wurden zwei sterile Polypropylengefäße mit ca. 0,5 ml Plasma befüllt und ebenfalls unverzüglich bei -80 °C gelagert.

3.3.3 Messung der Proben

Die Blut- und Vorderkammerproben wurden über Nacht im Kühlschrank auf Eis aufgetaut. Die Analyse der Proben wurde mit der Luminex®-xMAP-Mikrosphären-Multiplex-Technologie durchgeführt (Luminex® 200™, Luminex Incorporated, Austin, Texas).

Die sogenannte Luminex®-Technologie ermöglicht es, bis zu einhundert verschiedene Parameter in einer einzigen Probe und einem Messvorgang quantitativ zu bestimmen. Das Probenvolumen kann dabei sehr klein sein (30-100 µl). Es kommen mikroskopisch kleine Polystyrolpartikel, sogenannte Mikrosphären oder *Beads*, mit distinkten Fluoreszenz-Signaturen zum Einsatz, die analog zu beispielsweise einem *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) als Festphase für verschiedene biochemische Nachweisreaktionen dienen. Sphären eines bestimmten Fluoreszenz-Musters sind mit Antikörpern für bestimmte Zielanalyte beladen. Standards und Proben werden in Mikrowell-Platten pipettiert, vorhandene Zytokine werden an die Antikörper-beladenen Sphären gebunden. Es werden mit Biotin gekoppelte Reporter-Antikörper, die spezifisch für die jeweiligen Analyte sind, hinzugegeben, überschüssiges Reagenz wird abgespült und nach Analyt-Antikörperbindung werden Fluoreszenz-Reporter-Antikörper (Phycoerythrin) zugegeben. Es erfolgt eine Farbreaktion in Abhängigkeit von den zuvor gebundenen Zytokin-Mengen. Der Luminex®-200-Reader

erkennt durch ein Doppel-Lasersystem zunächst die Fluoreszenz-Signatur der Sphäre und dann die Intensität der Reporter-Fluoreszenz. So wird zuerst der Analyt klassifiziert und dann die Menge des aufgenommenen Zielanalyten bestimmt. Für die Luminex[®]-Technologie wurden am Zentrum für Augenheilkunde der Universitätsklinik Köln durch umfangreiche Vorversuche Standard-Protokolle für die Messung von Vorderkammerproben adaptiert und etabliert, da die Standard-Methodik sämtlicher Hersteller bislang nicht für die Messung von Vorderkammerproben ausgelegt ist. Diese wurden mit ELISAs verifiziert. Die Luminex[®]-Kits wurden über die Firma R&D-Systems, Deutschland bezogen.

Die Messungen wurden gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Einen Überblick über das Analyseprotokoll gibt Abbildung 1.

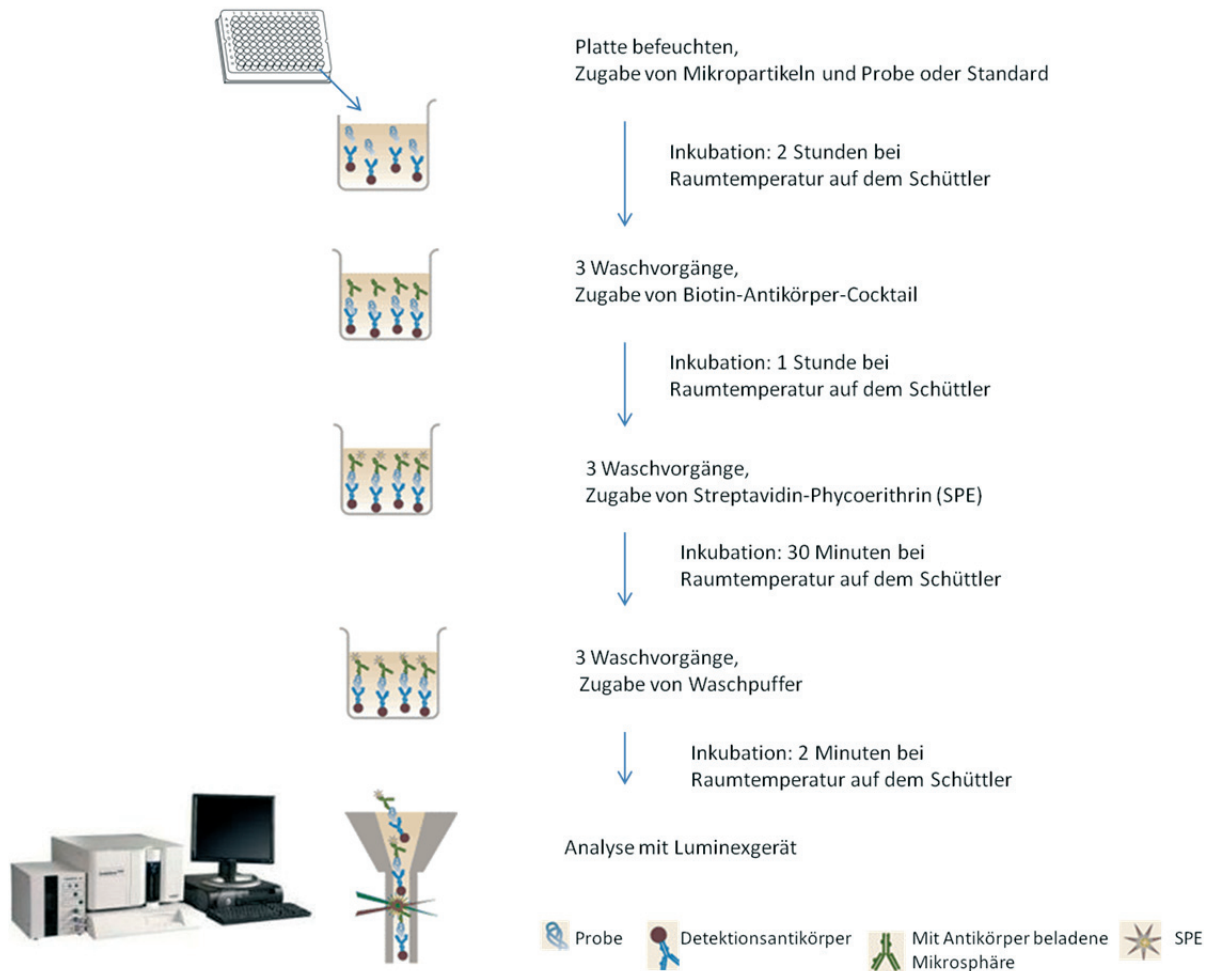


Abbildung 1: Überblick über das Analyseprotokoll mit der Luminex[®]-Technologie

Eigene Darstellung modifiziert nach einer Graphik von life-technologies[™], mit Bildern von Labortechnik Süsse bzw. performcentre.concordia.ca

Um verschiedene Analyte messen zu können, wurden unterschiedliche Kits desselben Herstellers verwendet (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland). Die jeweiligen Detektionslimits der einzelnen Analyte sowie die angewendeten Verdünnungen und Probenvolumina sind Tabelle 1 zu entnehmen. Die Proben wurden jederzeit vor Lichteinwirkung geschützt. Die Standardkurven wurden mit Hilfe der dem Kit beigelegten Referenzstandards generiert.

Tabelle 1: Detektionslimit der Analyte

<div> <div>Kit:</div> <div>Analyt:</div> </div>	Fluorokine [®] MAP Human Angiogenesis Base Kit A	VersaMAP [™] Human Custom Multi-Analyte Profiling Development System	Fluorokine [®] MAP Human Base Kit A	Fluorokine [®] MAP Human Angiogenesis Base Kit A 2012
IL-1 β	-	8,2	3,2	-
IL-4	-	-	5,1	-
IL-6	-	18,4	6,7	-
IL-8	-	13,5	4,0	-
IL-10	-	9,1	4,4	-
IL-12	-	-	-	-
IL-17	-	-	3,5	-
IFN-g	-	27,2	4,4	-
TNF-a	-	-	6,1	-
MCP-1	-	12,9	2,8	-
CRP	-	129	-	-
ICAM-1	-	1323	-	-
VCAM-1	-	5693	-	-
Angiogenin	2,49	-	-	-
Endostatin	21,97	-	-	-
PIGF	2,44	-	-	-
PDGF-AA	1,46	-	-	-
THBS-2	54,19	-	-	-
VEGF	2,24	16,44	3,9	2,0
FGF-a	5,37	-	-	-

Detektionslimit der einzelnen Analyte in pg/ml. „-,“= Analyt wurde nicht gemessen. Für Fluorokine[®] MAP Human Angiogenesis Base Kit A beträgt das Probenvolumen 100 μ l, die Verdünnung für Angiogenin 1:10, für alle anderen Analyte 1:2; für VersaMAP[™] Human Custom Multi-Analyte-Profiling Development System beträgt das Probenvolumen 50 μ l, die Verdünnung für die Plasmaproben 1:5, die Vorderkammerproben wurden nicht verdünnt; für Fluorokine[®] MAP Human Base Kit A beträgt das Probenvolumen 50 μ l, die Verdünnung der Plasmaproben 1:4; für das Fluorokine[®] MAP Human Angiogenesis Base Kit A beträgt das Probenvolumen 100 μ l, die Verdünnung 1:2.

3.3.4 Patientendaten

Für die folgenden Untersuchungen wurden 54 Patienten in die Gruppe der Patienten mit AMD eingeschlossen. Das Durchschnittsalter dieser Gruppe betrug 80,46 Jahre ($SD \pm 7,3$). Es wurden die Daten von 16 Patienten mit DME analysiert. Das Durchschnittsalter dieser Gruppe betrug 67,3 Jahre ($SD \pm 10,1$). In die Kontrollgruppe wurden insgesamt 32 Personen eingeschlossen. Das Durchschnittsalter der Kontrollgruppe betrug 70,7 Jahre ($SD \pm 9,1$). Für jeden Patienten wurden folgende Daten erhoben und gespeichert: Alter, Geschlecht, Studienauge, Einschlussdatum, Datum der Untersuchung bzw. Behandlung, Sehschärfe (ETDRS), CNV-Status („trocken“ = kein Ödem oder „feucht“ = Ödem, basierend auf den OCT- und Fluoreszenzangiographieergebnissen), Datum der Vorderkammerprobenentnahme und der gleichzeitig erfolgten intravitrealen Ranibizumab-Injektion.

3.3.5 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung wurde mit der Software SPSS (Version 19.0, IBM, Chicago, Illinois, USA) und Prism (Version 5, Graph Pad, Kalifornien, USA) durchgeführt, das Signifikanzniveau wurde auf $\alpha=0,05$ festgesetzt. Die Daten wurden auf Normalverteilung getestet und je nach Ergebnis wurde das entsprechende statistische Testverfahren, das im Weiteren jeweils näher ausgewiesen wird, ausgewählt.

3.3.6 Verwendete Geräte und verwendetes Material

Geräte

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
Kühlbox B35-85	Fryka Kältetechnik GmbH, Esslingen
Kühlschrank T 1400	Liebherr-International AG, Bulle, Schweiz
Luminex [®] 200 [™] System: <ul style="list-style-type: none">- Luminex[®]200[™] Analyzer- Luminex[®] XYP[™] Platform- Luminex[®] SDS[™] Sheath Delivery System- Dell PC	Invitrogen Corporation, Carlsbad, California & Luminex [®] Corporation, Austin, Texas
Plattform-Schüttler Titramax 100	Heidolph Instruments, Schwabach
Schüttler MS 3 digital	IKA [®] -Werke, Staufen

Tiefkühl-Schrank Hera freeze HFU 486 Basic bis -86°C	Heraeus, Hanau
Vortex-Genie 2T	Scientific Industries, Inc., Bohemia, New York, USA
Wasserstrahlpumpe, PP, Plastibrand	Brand GmbH + Co KG, Wertheim
Zentrifuge Typ 5415R mit Refrigerant R134A	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge Universal 320R	Hettich, Tuttlingen

Software

Microsoft Office Excel 2007	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Prism Version 5	Graph Pad, Kalifornien, USA
SPSS Version 19.0	IBM, Chicago, Illinois, USA
xPonent [®] v3.1 Software	Invitrogen Corporation, Carlsbad, California & Luminex [®] Corporation, Austin, Texas

Verbrauchsmaterialien

96-well-Platten, MaxiSorp [®] F	Nunc, Dänemark
Cryo.s [™] Einfrierröhrchen 2 ml, steril, Polypropylen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Falcon [™] , 15 ml und 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Glasflaschen Duran [®] 500 ml	Schott, Mainz
Insulinspritzen B D Plastipak [™]	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Monovetten [®] EDTA-K 2,7 ml und Serum-Gel	Sarstedt, Nümbrecht
PCR-Gefäße 0,5 ml, Reaktionsgefäße 1,5 ml	Brand GmbH + Co KG, Wertheim
Reagenz-Einweg-Reservoirs, 100 ml weiß PS	VWR International, Darmstadt

Serumpipetten 153 mm lang	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
---------------------------	--

Venenpunktionsbesteck Butterfly [®] -23 Venisystems [™]	Abbott, Irland
--	----------------

Chemikalien, Reagenzien und Antikörper

Lucentis [®] Injektionslösung	Novartis Pharma GmbH, Nürnberg
--	--------------------------------

Luminex[®] Assays:

Fluorokine MAP Human Angiogenesis Base Kit A	R&D Systems GmbH, Wiesbaden, Deutschland und R&D Systems [®] , Minneapolis, MN
--	---

Fluorokine MAP Human Base Kit A

VersaMAP Human Custom Multi-Analyte Profiling
Development System

sowie die Analyte (Mikropartikel-Konzentrat und
Biotin-Antikörper-Konzentrat, alle human):

Angiogenin, CRP, Endostatin, FGF- α , ICAM-1, IL-
1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IFN- γ , MCP-1,
PDGF-AA, PlGF, TNF- α , THBS-2, VCAM-1,
VEGF

Luminex [®] 100/200 Calibration Kit	R&D Systems GmbH, Wiesbaden, Deutschland und R&D Systems [®] , Minneapolis, MN
--	---

Luminex [®] 100/200 Performance Verification Kit	R&D Systems GmbH, Wiesbaden, Deutschland und R&D Systems [®] , Minneapolis, MN
---	---

Luminex [®] XMAP [™] Sheath fluid	Invitrogen Corporation, Carlsbad, California & Luminex [®] Corporation, Austin, Texas
---	--

Natriumhypochloritlösung 12% Cl (NaClO in H ₂ O M 74,45 sine H ₂ O D~1,22)	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe
---	------------------------------

4. Ergebnisse

4.1 Altersabhängige Makuladegeneration

4.1.1 VEGF in Vorderkammerproben

Um bei AMD-Patienten die Wirkung von Ranibizumab auf die VEGF-Spiegel im Auge nachzuvollziehen, wurden zunächst 47 Augen von 47 Patienten mit exsudativer AMD untersucht. Das VEGF-Level wurde durchschnittlich 9,4-mal ($SD \pm 4,1$, Bereich: 3-18) pro Patient in der Vorderkammerflüssigkeit bestimmt. Im Rahmen der Behandlung bekamen die Patienten jeweils 3 Spritzen (= Serie) mit 0,5 mg Ranibizumab intravitreal injiziert. Es schlossen sich monatliche Kontrolluntersuchungen an. Bei der Kontrolluntersuchung wurde festgestellt, ob eine Persistenz des Geschehens vorlag und somit eine erneute Spritzenserie erforderlich war oder ob sich das Ödem zurückgebildet hatte (Befund „trocken“) und eine weitere Kontrolluntersuchung in ca. vier Wochen durchgeführt werden sollte. Falls sich bei dieser erneuten Kontrolle ein Rezidiv zeigte, wurde eine weitere Spritzenserie vorgenommen. Vier Wochen danach wurde der Therapieverlauf wiederum kontrolliert und die Behandlung entsprechend fortgeführt. Vor der jeweiligen intravitrealen Injektion wurde eine Probe aus der Vorderkammer entnommen und später analysiert.

Bei der Analyse konnte festgestellt werden, dass die Level von VEGF vor der jeweils zweiten und dritten Spritze der Serie noch gesenkt waren. Unmittelbar vor der Verabreichung einer neuen Serie mit 3 intravitrealen Spritzen waren die VEGF-Werte in der Vorderkammer wieder angestiegen (Abbildung 2).

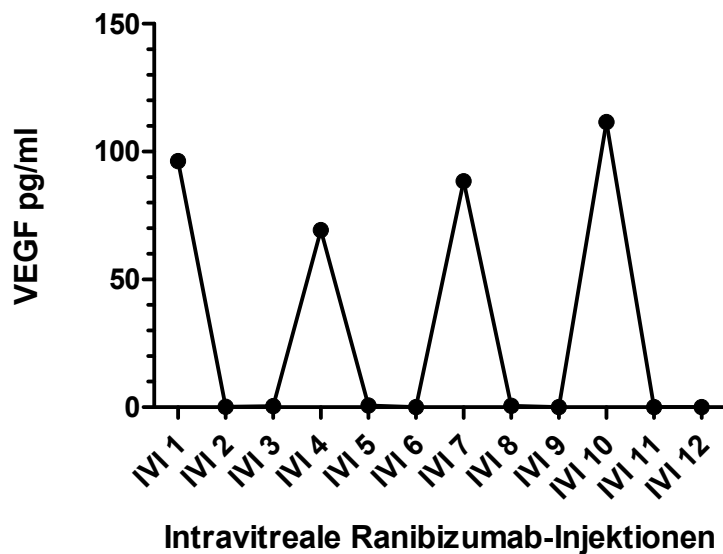


Abbildung 2: VEGF in pg/ml in der Vorderkammerflüssigkeit eines Patienten

IVI=Intravitreale Injektion; die VEGF-Werte wurden in den Vorderkammerproben, die vor der jeweiligen intravitrealen Verabreichung der Ranibizumab-Spritzen genommen wurden, gemessen. Die Analyse erfolgte mit Fluorokine® MAP Human Base Kit A

Um zu bestimmen, wie lange die Suppression der VEGF-Level im Auge anhält, wurde die Korrelation zwischen dem Zeitintervall von der vorhergehenden intravitrealen Ranibizumab-Injektion bis zur darauffolgenden Injektion und dem VEGF-Level direkt vor dieser nachfolgenden Injektion für jeden Patienten bildlich dargestellt (Abbildung 3). Auf der x-Achse wird in Tagen der zeitliche Abstand zur vorhergehenden intravitrealen Ranibizumab-Injektion aufgetragen. Die erste Injektion wurde als Tag 0 definiert. Eine vollständige Suppression von VEGF wurde bei VEGF-Werten $< 4\text{pg/ml}$, dem Detektionslimit der analytischen Methode, angenommen. Die Messwerte häufen sich zwischen Tag 30 bis 40 nach der ersten Injektion, da monatliche Injektionen im Rahmen des Behandlungsschemas vorgesehen waren. Messungen mit längerem Intervall korrespondieren mit Rezidiven nach vorangegangenen trockenen Intervallen. Um zu bestimmen, wie lange die VEGF-Suppression in der Vorderkammerflüssigkeit anhält, wurden für jeden Patienten die Intervalle bestimmt, bei denen VEGF definitiv supprimiert war, bei denen VEGF definitiv nicht supprimiert war, und es wurde diejenige Zeitspanne ermittelt, für die der VEGF-Status unbekannt blieb, da während dieses Zeitraums keine Messwerte erhoben werden konnten.

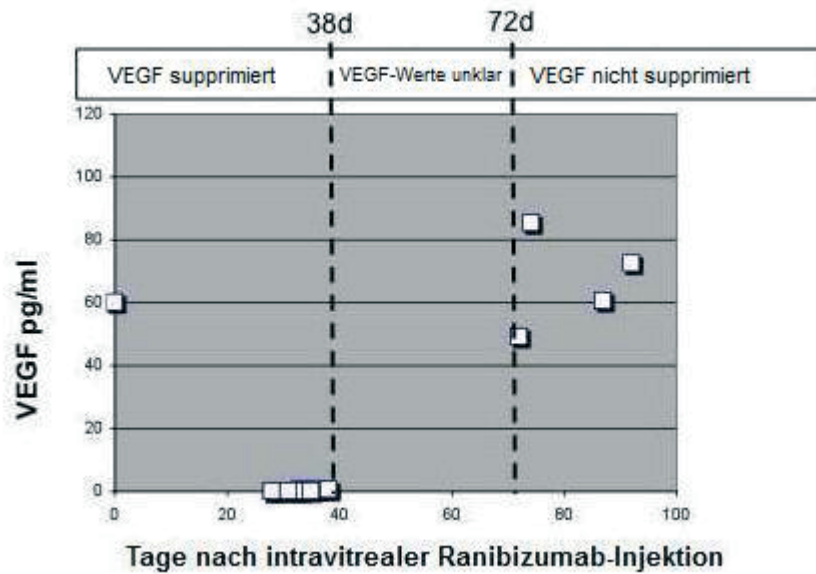


Abbildung 3: VEGF-Status in der Vorderkammer eines Patienten in Abhängigkeit von der Zeit nach intravitrealer Ranibizumab-Injektion

Dieses Beispiel eines Patienten illustriert das Zeitintervall zwischen den Ranibizumab-Injektionen und reflektiert die beobachtete Suppression von VEGF (bis Tag 38) und den beobachteten Verlust der VEGF-Suppression (nach Tag 72). Das VEGF-Level ist bei diesem Patienten zwischen Tag 38 bis 72 aufgrund mangelnder Daten für diesen Zeitraum unbekannt. VEGF=vascular *endothelial growth factor*, d=Tag

Aus diesen Daten lässt sich bei jedem Patienten die Zeitspanne, in der VEGF mit Sicherheit supprimiert war, und die VEGF-Werte, die ohne Suppression gemessen wurden, ablesen (Abbildung 4).

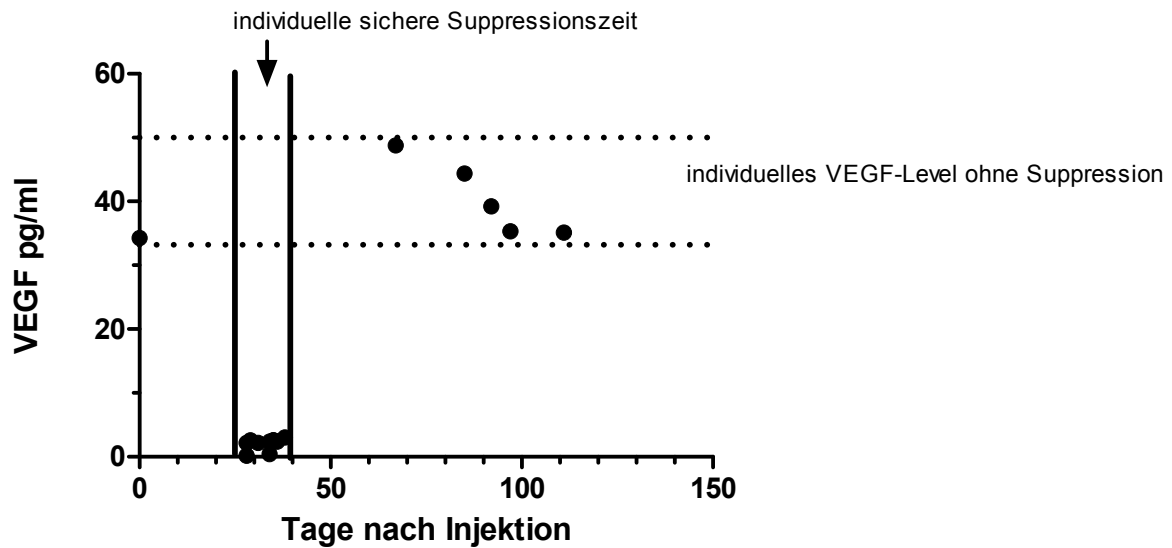


Abbildung 4: VEGF-Werte in der Vorderkammer eines Patienten mit und ohne Suppression in Abhängigkeit von der Zeit nach intravitrealer Ranibizumab-Injektion

Dieses Beispiel eines Patienten zeigt dessen individuelle VEGF-Werte in der Vorderkammer ohne Suppression (34 bis 48 pg/ml) und illustriert das Zeitintervall in Tagen, bei dem von einer sicheren Suppression der VEGF-Werte ausgegangen werden kann (28 bis 38 Tage nach Ranibizumab-Injektion)

Die Zeitspannen dieser drei Werte (VEGF supprimiert, VEGF-Status unbekannt, VEGF nicht supprimiert) für alle Patienten (n=47) sind in der folgenden Grafik zusammengefasst (Abbildung 5). Daraus lässt sich ablesen, bei wie viel Prozent der Patienten zu einem bestimmten Zeitpunkt nach erfolgter intravitrealer Verabreichung von Ranibizumab VEGF supprimiert oder nicht mehr supprimiert war.

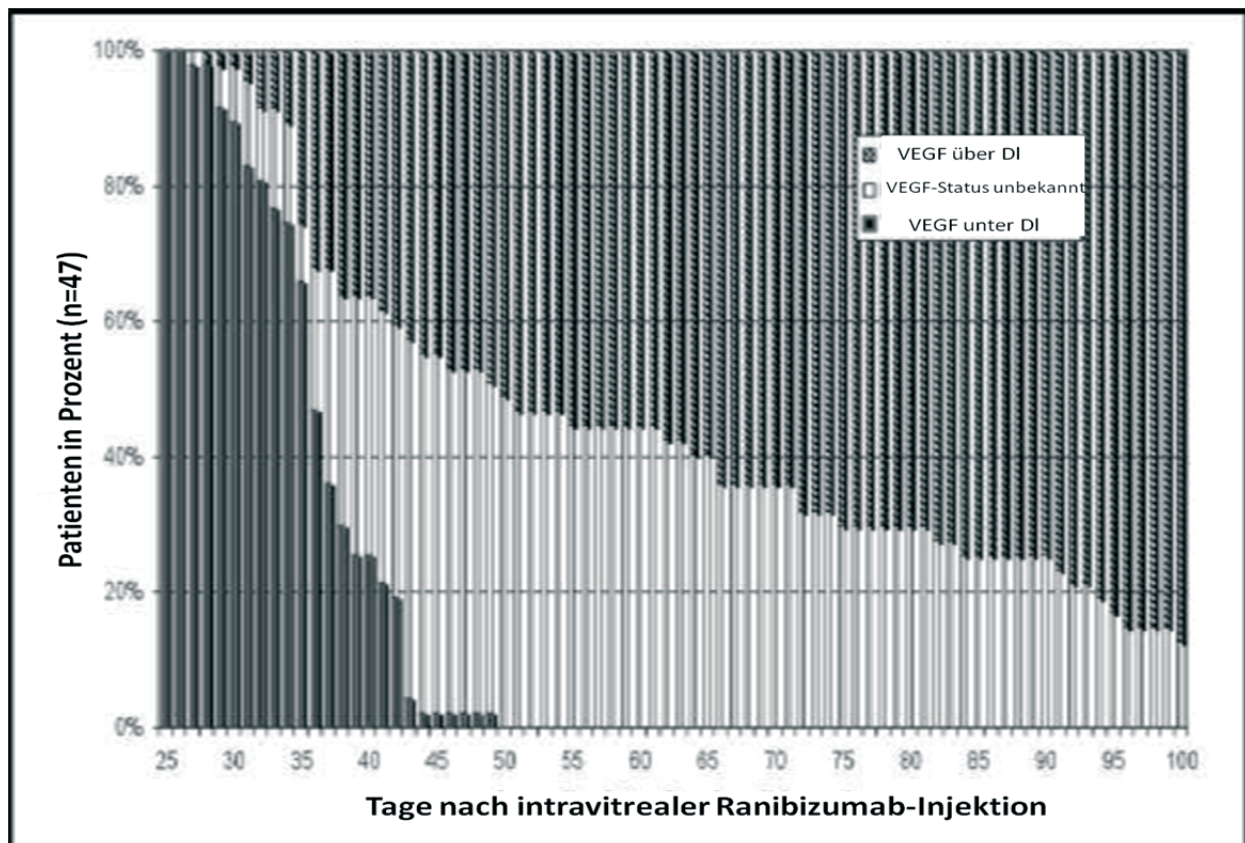


Abbildung 5: Stapelbalkendiagramm für den Prozentanteil der AMD-Patienten mit VEGF-Werten oberhalb und unterhalb des Detektionslimits für Tag 25 bis 100 nach intravitrealer Ranibizumab-Injektion

Die tatsächliche Dauer der Suppression liegt im „unbekannten“ Bereich. Der Charakter der Studie erlaubte keine frei festgesetzten Zeitspannen für die Injektionen. Die Daten wurden auf der Basis der generellen Variabilität der Reinjektionsdaten generiert. VEGF=*vascular endothelial growth factor*, DI=Detektionslimit

Die Analysen ergaben, dass durch Ranibizumab VEGF im Vorderkammerwasser für die durchschnittliche Dauer von 37,79 Tagen ($SD \pm 4,84$, Bereich: 26-49 Tage, Median 35 Tage) supprimiert wurde.

Im Folgenden wurde analysiert, ob die VEGF-Spiegel in der Vorderkammer einen Einfluss auf die Ausbildung eines Rezidivs haben.

Wenn Rezidive festgestellt wurden, waren die VEGF-Werte nie supprimiert; sie lagen bei 74,14 pg/ml ($SD \pm 35,16$, Bereich 28,4-231 pg/ml, Median 68 pg/ml). Die Unterschiede zwischen den VEGF-Werten vor Therapie und zur Zeit des Rezidivs sind statistisch nicht signifikant (69,3 pg/ml *versus* 74,14 pg/ml, 95% Konfidenzintervall, -18,87 bis 9,12). Rezidive wurden durchschnittlich 93,7 Tage ($SD \pm 69,9$, Bereich 57-368 Tage) nach der vorangegangenen Ranibizumab-Behandlung festgestellt.

Es wurde untersucht, ob die Dauer der individuellen Suppression von VEGF in der Vorderkammer mit dem Auftreten eines Rezidivs im Zusammenhang steht. Eine Korrelation zwischen der individuellen Suppressionsdauer und dem Auftreten eines Rezidivs konnte nicht festgestellt werden. So zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede hinsichtlich der individuellen Suppressionszeit und dem Auftreten von persistierenden ($36,61 \text{ Tage} \pm 5,35 \text{ SD}$), trockenen (3-6 Monate ($39,75 \text{ Tage} \pm \text{SD } 11,07$) bzw. 6-9 Monate ($33,63 \pm \text{SD } 4,07$)) oder rezidivierenden ($36,21 \text{ Tage} \pm \text{SD } 8,02$) Krankheitsgeschehen (Kruskal-Wallis-Test, $p=0,34$, $n=8-19$).

Desweiteren besteht kein Zusammenhang zwischen der Häufigkeit eines Rezidivs innerhalb von 2 Jahren und der Länge der individuellen Suppression von VEGF in der Vorderkammer (Spearman Korrelation, $r=0,39$, $p=0,18$).

Um zu untersuchen, ob sich die Spiegel von VEGF und anderen Zytokinen in der Vorderkammerflüssigkeit von AMD-Patienten von denen einer gesunden Kontrollgruppe unterscheiden, wurden weitere Vorderkammer-Proben mit Hilfe der Luminex[®]-Technologie analysiert. Die Messungen der Vorderkammerproben ergaben keine statistisch signifikante Erhöhung von VEGF bei den Patienten mit AMD im Vergleich zur Kontrollgruppe (s. Tabelle 2).

Tabelle 2: Vergleich der Zytokinspiegel in der Vorderkammerflüssigkeit bei den AMD-Patienten und der Kontrollgruppe

Zytokin	AMD-Patienten	Kontrollgruppe	p-Wert
VEGF	46,3 ± 22,2 n=44	35,8 ± 20,8 n=21	0,1105
MCP-1	619,8 ± 263,3 n=24	384,1 ± 124,3 n=21	0,0007
IL-6	54,5 ± 143,5 n=24	4,8 ± 11,9 n=21	0,0230
IL-8	8,4 ± 8,4 n=24	4,5 ± 2,1 n=21	0,0136
VCAM-1	57539 ± 35865 n=24	42019 ± 37340 n=21	0,0098
ICAM-1	288,9 ± 273,1 n=24	43,6 ± 103,8 n=21	<0,0001
CRP	7237 ± 4879 n=21	9190 ± 16429 n=21	0,1908
IL-10	1,8 ± 0,81 n=24	nicht nachweisbar n=21	-
IL-1 β	nicht nachweisbar	nicht nachweisbar	-
IFN- γ	nicht nachweisbar	nicht nachweisbar	-

Zytokine gemessen in Vorderkammerproben mit der Luminex®-Technologie, VersaMAP™ Human Custom Multi-Analyte-Profilng Development System, Angabe in pg/ml als Mittelwert ± Standardabweichung, statistische Analyse mit Mann-Whitney-Test, Signifikanzniveau $\alpha=0,05$, n=Probenanzahl, „-“,=statistischer Test nicht durchführbar, p-Wert in Fettdruck=statistisch signifikant

4.1.2 VEGF in Vorderkammerproben in Langzeitbeobachtung

Es wurde untersucht, ob sich die individuellen, nicht supprimierten Spiegel von VEGF in der Vorderkammerflüssigkeit im Laufe der Therapie mit Ranibizumab, vor allem auch in der Langzeittherapie, in ihrer absoluten Höhe verändern. Dazu wurde ein Vergleich der VK-VEGF-Level vor Therapie mit den VK-VEGF-Werten, die unmittelbar vor einer erneuten, wegen Feststellung eines Rezidivs oder einer Persistenz des Ödems notwendig gewordenen, Spritzenserie gemessen wurden, vorgenommen. Es zeigte sich, dass kein statistisch

signifikanter Unterschied zwischen den individuellen VEGF-Werte vor der 1., 4., 7., 10. und 13. Spritze besteht (Friedman-Test $p=0,83$, *Dunn's Multiple Comparison*-Test nicht signifikant, 5 Gruppen, $n=12$). Auch zwischen dem Ausgangswert (vor der ersten intravitrealen Spritze) und dem VEGF-Wert, der am Anfang der fünften Spritzenserie, d.h. unmittelbar vor der 16. intravitrealen Injektion, erhoben wurde, ist kein statistisch signifikanter Unterschied zu verzeichnen (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, $p=0,57$, $n=7$). Es wurde kein Unterschied der individuellen, nicht supprimierten VK-VEGF-Werte im Langzeitverlauf festgestellt.

4.1.3 VEGF in Vorderkammer und Plasma

Es wurde untersucht, ob sich im Plasma Unterschiede zwischen den AMD-Patienten und der gesunden Kontrollgruppe bezüglich der einzelnen Zytokinspiegel zeigen. Dabei wurde festgestellt, dass zwischen beiden Gruppen kein statistisch signifikanter Unterschied hinsichtlich der Plasma-VEGF-Werte existiert (Tabelle 3).

Um zu prüfen, ob ein Zusammenhang zwischen den Werten in der Vorderkammer und den Werten im Plasma besteht, wurden die Daten der einzelnen Patienten korreliert. Eine Korrelation zwischen den VEGF-Werten in der Vorderkammer und den VEGF-Werten im Plasma konnte nicht nachgewiesen werden. Dies gilt sowohl für die AMD-Patienten als auch für die Kontrollgruppe. Auch wenn man das Patientengut in zwei Gruppen unterteilt, in denen die eine Gruppe hohe VEGF-Ausgangswerte in der VK hat und die andere niedrige Ausgangswerte, kann keine Korrelation in dem Sinne hergestellt werden, dass hohe VK-Level auf hohe Plasmalevel bzw. niedrige VK-Werte auf niedrige Plasmawerte schließen lassen. Gleiches gilt auch, wenn man das Patientengut anhand der Plasmawerte in zwei Gruppen einteilt. Auch hier ist keine Korrelation zwischen Blut- und VK-Leveln festzustellen (Korrelationen nach Pearson bzw. Spearman für $\alpha = 0,05$ nicht signifikant).

4.1.4 VEGF im Plasma unter Therapie

Die erste Blutabnahme, die vor Beginn der Ranibizumab-Therapie genommen wurde, wies höhere VEGF-Werte im Plasma auf ($34,56 \text{ pg/ml} \pm \text{SD } 20,21$) als die zweite Blutprobe, die zu einem beliebigen Zeitpunkt während der Therapie mit Ranibizumab genommen wurde ($16,90 \pm \text{SD } 12,97$, Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, $P<0,0001$, $n=31$). VEGF war vor Therapie im Plasma in höheren Konzentrationen nachweisbar ($37,45 \text{ pg/ml} \pm \text{SD } 23,21$) als unter unmittelbarer Therapie mit Ranibizumab (= während Spritzenserie, $21,62 \text{ pg/ml} \pm \text{SD } 20,40$, gepaarter t-Test $p=0,04$ $n=9$). Die Analyse der Plasmakonzentrationen von VEGF unter der

Therapie mit Ranibizumab ergab, dass diese statistisch signifikant niedriger waren als die Vergleichswerte der gesunden Kontrollgruppe (16,90 pg/ml *versus* 31,58 pg/ml, Mann-Whitney-Test $n=23-31$, $p=0,0397$). Außerdem lagen die Plasmalevel von VEGF im Therapiestadium „trocken“ (17,43 pg/ml \pm SD 6,54) deutlich unterhalb der Ausgangslevel (36,03 pg/ml \pm SD 18,06, gepaarter t-Test $p=0,008$ $n=9$). Bei Patienten, die als „trocken“ diagnostiziert waren und bei denen die letzte Ranibizumab-Spritze zwischen 5,5-11 Monate zurücklag, befanden sich die Plasma-VEGF-Werte noch deutlich unterhalb der Ausgangsplasmawerte (16,88 pg/ml \pm 4,97 SD *versus* 32,01pg/ml \pm SD 10,28, Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test $p=0,03$, $n= 6$).

4.1.5 Andere Zytokine in Vorderkammerproben

Neben VEGF wurden weitere Zytokine in den Proben gemessen. Im Vergleich zur Kontrollgruppe waren in der Vorderkammer die Werte von *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8), *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) und *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) erhöht.

C-reaktives Protein (CRP) war im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht erhöht.

Interleukin-10 (IL-10) war bei der Kontrollgruppe nicht, bei der Gruppe der AMD-Patienten nur in sehr geringen Konzentrationen nachweisbar. Interleukin- 1β (IL- 1β) und Interferon- γ (IFN- γ) waren weder bei den AMD-Patienten noch bei der Kontrollgruppe nachweisbar (Tabelle 2).

Korrelationen zwischen den einzelnen Zytokinen, vor allem auch im Therapieverlauf, waren nicht feststellbar (Korrelationen nach Pearson bzw. Spearman für $\alpha = 0,05$ nicht signifikant).

4.1.6 Zytokine in Vorderkammerproben unter Therapie mit Ranibizumab

Es wurde die Entwicklung der einzelnen Zytokinspiegel unter Einfluss der Therapie mit Ranibizumab untersucht. Es wurde festgestellt, dass sich die Spiegel von Angiogenin, Endostatin, *fibroblast growth factor-acidic* (FGF-a), *placental growth factor* (PlGF), *platelet-derived growth factor-AA* (PDGF-AA), Thrombospondin-2 (THBS-2), IL-6, IL-8, IL-10, MCP-1, ICAM-1, VCAM-1 und CRP im Kammerwasser der AMD-Patienten im Verlauf der intravitrealen Spritzenbehandlung nicht statistisch signifikant verändern (ANOVA mit Messwiederholung und *Bonferroni's multiple comparison*-Test für $p < 0,05$ nicht signifikant).

Nachfolgend wurde analysiert, ob die Zytokinvorderkammerspiegel bei Vorliegen eines Rezidivs oder eines persistierenden Krankheitsgeschehens verändert sind (Ergebnisse nicht graphisch dargestellt).

Es wurde festgestellt, dass die Werte von THBS-2 zum Zeitpunkt eines Rezidivs höher waren als die Ausgangswerte (Mann-Whitney-Test, $p=0,0439$, $n=14-22$).

Die Werte von Endostatin waren ebenfalls bei Vorliegen eines Rezidivs erhöht (ungepaarter t-Test, $p=0,0117$, $n=13-23$).

Bei Angiogenin waren die Werte bei einer Persistenz höher als die Anfangswerte (ungepaarter t-Test, $p=0,0069$, $n=12-15$).

Auch bei PDGF waren bei einer Persistenz die Werte höher als zu Anfang (Mann-Whitney-Test $p=0,018$, $n=13-16$).

Bei IL-8, MCP-1, FGF-a, PlGF, IL-6, VCAM-1, ICAM-1 und CRP konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zu den verschiedenen Zeitpunkten festgestellt werden.

4.1.7 Zytokine im Plasma

Es wurde untersucht, ob Unterschiede bei den Zytokinspiegeln im Plasma zwischen der Gruppe der AMD-Patienten und der Kontrollgruppe existieren (Tabelle 3). Die Plasmamessungen ergaben, dass die Level von IL-8 und CRP bei den Patienten mit AMD höher waren als bei den gesunden Kontrollpersonen.

Die Plasmawerte von MCP-1 waren hingegen bei der Kontrollgruppe höher als bei den AMD-Patienten.

Bezüglich der Spiegel von ICAM-1 und VCAM-1 konnten keine Unterschiede im Plasma zwischen beiden Gruppen festgestellt werden. Die Werte von IL-6 wurden bei beiden Gruppen in geringen, die Werte von TNF- α in sehr geringen Konzentrationen gemessen, die Spiegel unterschieden sich nicht statistisch signifikant. Die Werte von IL-10 und IL-17 konnten bei der Kontrollgruppe nicht und bei der AMD-Gruppe nur in sehr geringen Mengen gemessen werden. IFN- γ , IL-1 β und IL-4 konnten im Plasma nicht nachgewiesen werden.

Tabelle 3: Vergleich der Zytokinspiegel im Plasma bei den AMD-Patienten und der Kontrollgruppe

Zytokin	AMD-Patienten	Kontrollgruppe	p-Wert
VEGF	35,38 ± 22,12 n=23	31,58 ± 29,41 n=23	0,2967
IL-8	9,366 ± 3,805 n=23	7,135 ± 4,242 n=23	0,0198
CRP	326435 ± 94331 n=24	261435 ± 80588 n=23	0,0110
MCP-1	120,5 ± 29,57 n=23	167,3 ± 77,14 n=23	0,0187
IL-6	4,648 ± 1,517 n=23	4,327 ± 0,9714 n=23	0,6890
TNF-α	0,2966 ± 0,7101 n=23	0,08442 ± 0,3026 n=23	0,3676
VCAM-1	1421000 ± 400110 n=24	1423000 ± 1170000 n=23	0,0721
ICAM-1	51729 ± 20261 n=24	52998 ± 36090 n=23	0,4759
IL-1β	nicht nachweisbar n=23	nicht nachweisbar n=23	-
IL-17	0,5735 ± 0,3421 n=23	nicht nachweisbar n=23	-
IL-4	nicht nachweisbar n=23	nicht nachweisbar n=23	-
IL-10	0,1979 ± 0,1979 n=23	nicht nachweisbar n=23	-
IFN-γ	nicht nachweisbar n=23	nicht nachweisbar n=23	-

Zytokine gemessen in Plasmaproben mit der Luminex®-Technologie, Fluorokine® MAP Human Base Kit A und VersaMAP™ Human Custom Multi-Analyte-Profilng Development System, Angabe in pg/ml als Mittelwert ± Standardabweichung, statistische Analyse mit Mann-Whitney-Test, Signifikanzniveau α=0,05, n=Probenanzahl, „-“,=statistischer Test nicht durchführbar, p-Wert in Fettdruck=statistisch signifikant

Während der Therapie mit Ranibizumab veränderten sich die Plasmalevel von IL-17, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , MCP-1, CRP, VCAM-1 und ICAM-1 nicht signifikant (gepaarter t-Test bzw. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für $\alpha = 0,05$ nicht signifikant).

Es existieren keine Korrelationen zwischen den Vorderkammer- bzw. Plasmawerten der einzelnen Zytokine (Korrelationen nach Pearson bzw. Spearman für $\alpha = 0,05$ nicht signifikant).

4.2 Diabetisches Makulaödem

4.2.1 VEGF und andere Zytokine in Vorderkammerproben

Zunächst wurden die Vorderkammerproben der Patienten mit diabetischem Makulaödem bezüglich der VEGF-Spiegel analysiert. Das VEGF-Level wurde durchschnittlich 5,4-mal ($SD \pm 2,7$) pro Patient bestimmt. Bei den Patienten mit DME zeigt sich eine Erhöhung der VK-VEGF-Level vor Therapie im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Es wurden weiterhin IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IFN- γ , MCP-1, VCAM-1, ICAM-1 und CRP in den Vorderkammerproben der Diabetiker gemessen. Dabei wurde festgestellt, dass die MCP-1-, VCAM-1- und IL-8-Level gegenüber den Werten der Kontrollen erhöht sind.

Die Spiegel von ICAM-1 und CRP sind im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht erhöht.

IL-10, IL-1 β und IFN- γ konnten in den Vorderkammerproben nicht nachgewiesen werden. Bezüglich IL-6 können aufgrund geringer Probenanzahl keine Aussagen getroffen werden (Abbildung 6).

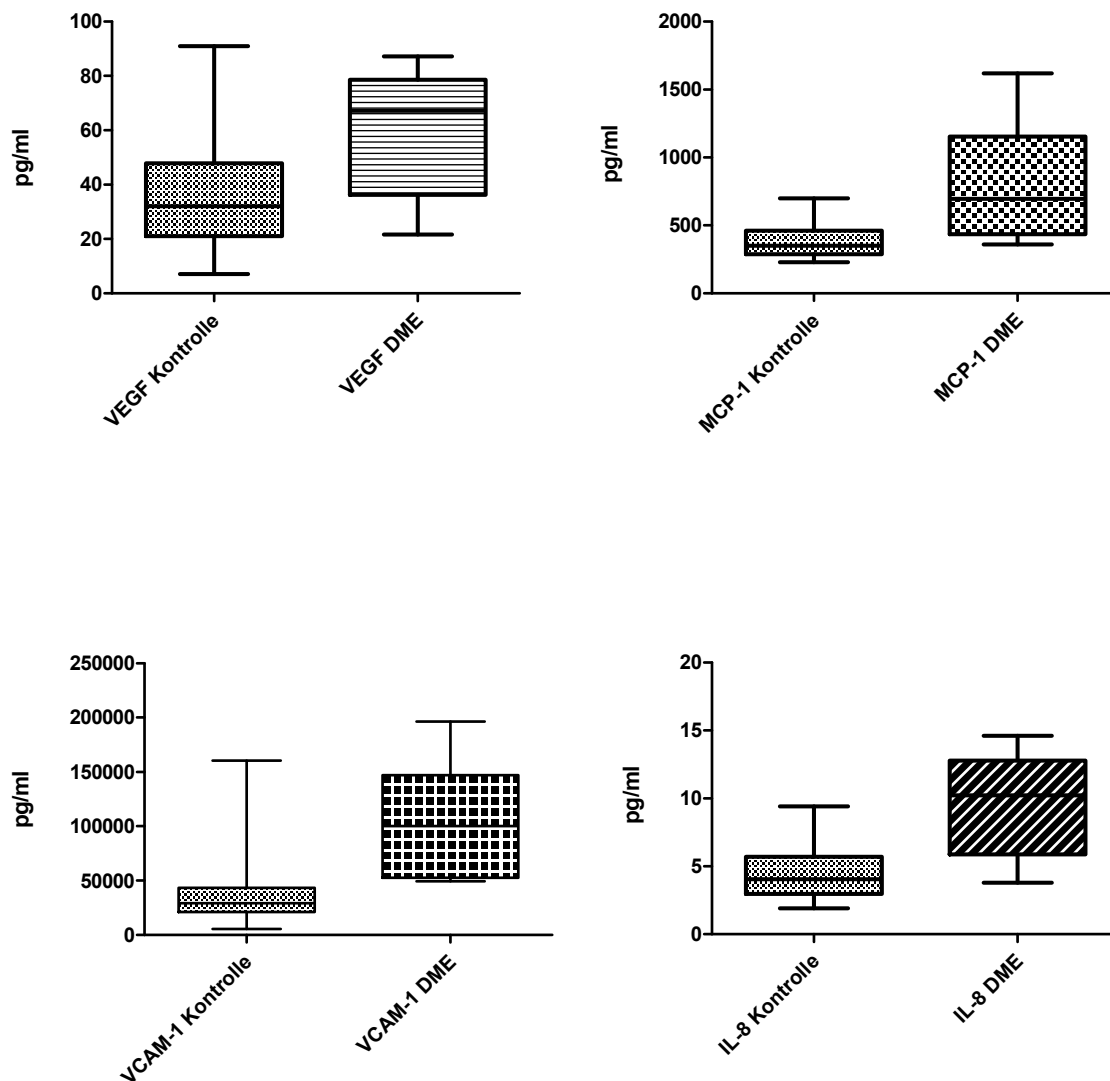


Abbildung 6: Zytokinlevel in pg/ml in der Vorderkammerflüssigkeit bei den DME-Patienten und der Kontrollgruppe

Box-Plot-Darstellung; Messung der Proben mit VersaMAP Human Custom Multi-Analyte Profiling Development System, statistische Analyse mit Mann-Whitney-Test, Signifikanzlevel $p \leq 0,05$, n =Probenanzahl, SD=Standardabweichung. Für den Vergleich VEGF-Kontrolle mit VEGF-DME gilt: 35,85 pg/ml \pm SD 20,84 versus 59,07 pg/ml \pm SD 23,47 $n=7-21$, $p=0,0338$; für MCP-1-Kontrolle mit MCP-1-DME: 384,1 pg/ml \pm SD 124,3 versus 803,6 pg/ml \pm SD 470,5 $n=6-21$, $p=0,008$; für VCAM-1-Kontrolle mit VCAM-1-DME: 42020 pg/ml \pm SD 37340 versus 105037 pg/ml \pm SD 54477 $n=6-23$, $p=0,0039$; für IL-8-Kontrolle mit IL-8-DME: 4,562 pg/ml \pm SD 2,129 versus 9,602 pg/ml \pm SD 3,945 $n=6-21$, $p=0,0094$.

4.2.2 VEGF und andere Zytokine in Vorderkammerproben unter Therapie

Im Verlauf der Therapie mit Ranibizumab wurden die Level von VEGF in der Vorderkammer gesenkt (Abbildung 7). Die Level von IL-6, IL-10, IL-8, MCP-1, IL-1 β , IFN- γ , VCAM-1,

ICAM-1 und CRP veränderten sich nicht signifikant (ANOVA mit Messwiederholung und *Bonferroni's multiple comparison*-Test für $p < 0,05$ nicht signifikant).

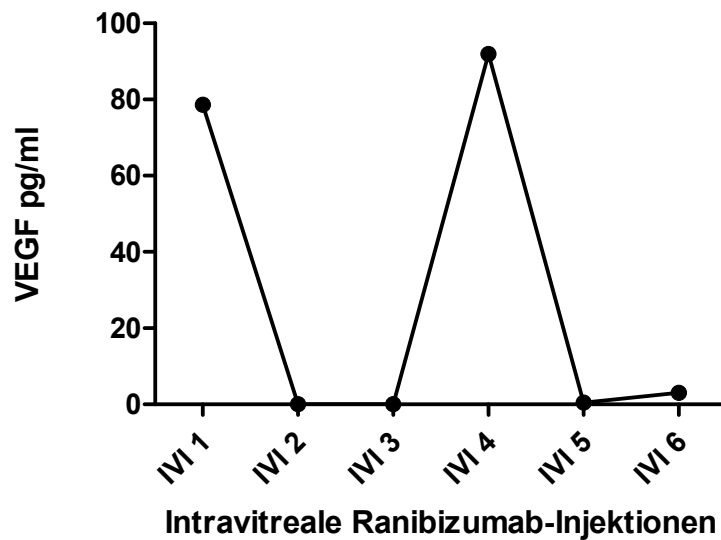


Abbildung 7: VEGF in pg/ml in der Vorderkammerflüssigkeit eines Patienten mit DME

IVI=Intravitreale Injektion; die VEGF-Werte wurden in den Vorderkammerproben, die vor der jeweiligen intravitrealen Verabreichung der Ranibizumab-Spritzen genommen wurden, gemessen.

Pro Patient (n=16) wurden die Intervalle zwischen den einzelnen Injektionen (in Tagen) graphisch mit dem dazugehörigen VEGF-Wert aufgetragen (Abbildung 8).

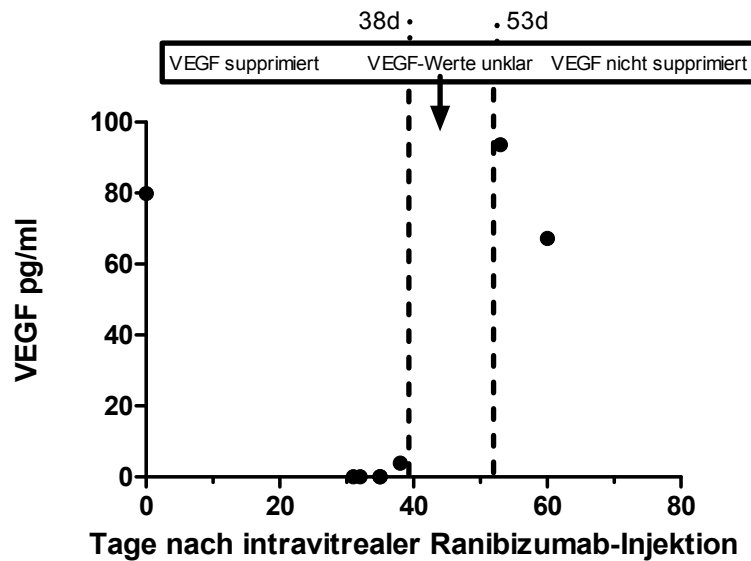


Abbildung 8: VEGF-Status in der Vorderkammer eines Patienten in Abhängigkeit von der Zeit nach intravitrealer Ranibizumab-Injektion

Dieses Beispiel eines Patienten illustriert das Zeitintervall zwischen den Ranibizumab-Injektionen und reflektiert die beobachtete Suppression von VEGF (bis Tag 38) und den beobachteten Verlust der VEGF-Suppression (nach Tag 53). Das VEGF-Level ist bei diesem Patienten zwischen Tag 38 bis 53 aufgrund mangelnder Daten für diesen Zeitraum unbekannt. VEGF=*vascular endothelial growth factor*, d=Tag

Aus diesen Daten lässt sich bei jedem Patienten die Zeitspanne, in der VEGF mit Sicherheit supprimiert ist, und die VEGF-Werte, die ohne Suppression gemessen wurden, ablesen (Abbildung 9).

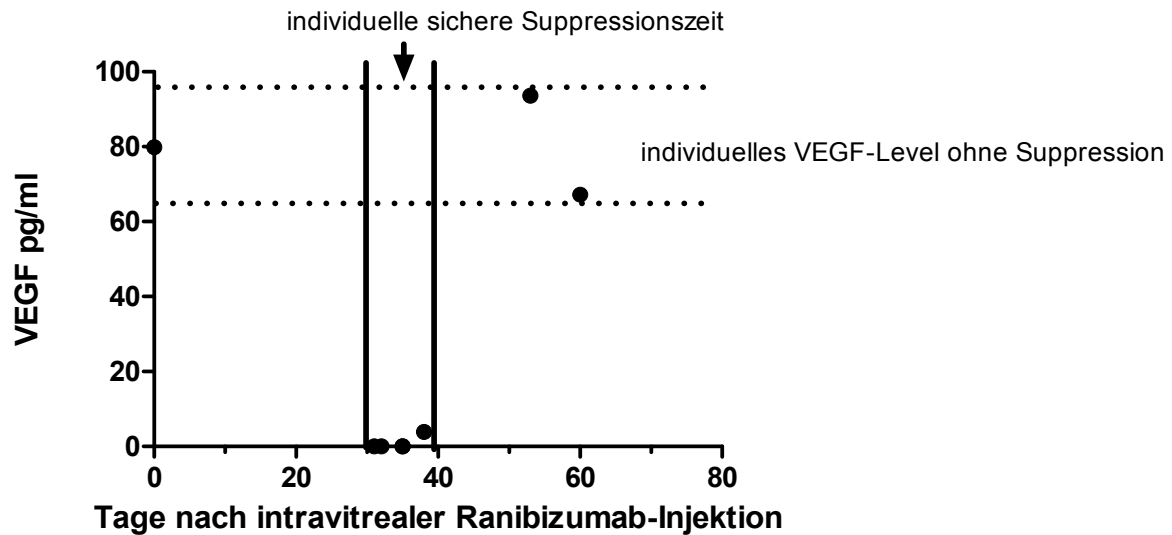


Abbildung 9: VEGF-Werte in der Vorderkammer eines Patienten mit und ohne Suppression in Abhängigkeit von der Zeit nach intravitrealer Ranibizumab-Injektion

Dieses Beispiel eines Patienten mit DME zeigt dessen individuelle VEGF-Werte in der Vorderkammer ohne Suppression (67 bis 93 pg/ml) und illustriert das Zeitintervall in Tagen, bei dem von einer sicheren Suppression der VEGF-Werte ausgegangen werden kann (31 bis 38 Tage nach Ranibizumab-Injektion)

Die Zeitspannen dieser drei Werte (VEGF supprimiert, VEGF-Status unklar, VEGF nicht supprimiert) für alle Patienten sind in der folgenden Grafik zusammengefasst (Abbildung 10). Daraus lässt sich ablesen, bei wie viel Prozent der Patienten zu einem bestimmten Zeitpunkt nach erfolgter intravitrealer Verabreichung von Ranibizumab VEGF supprimiert oder nicht mehr supprimiert war.

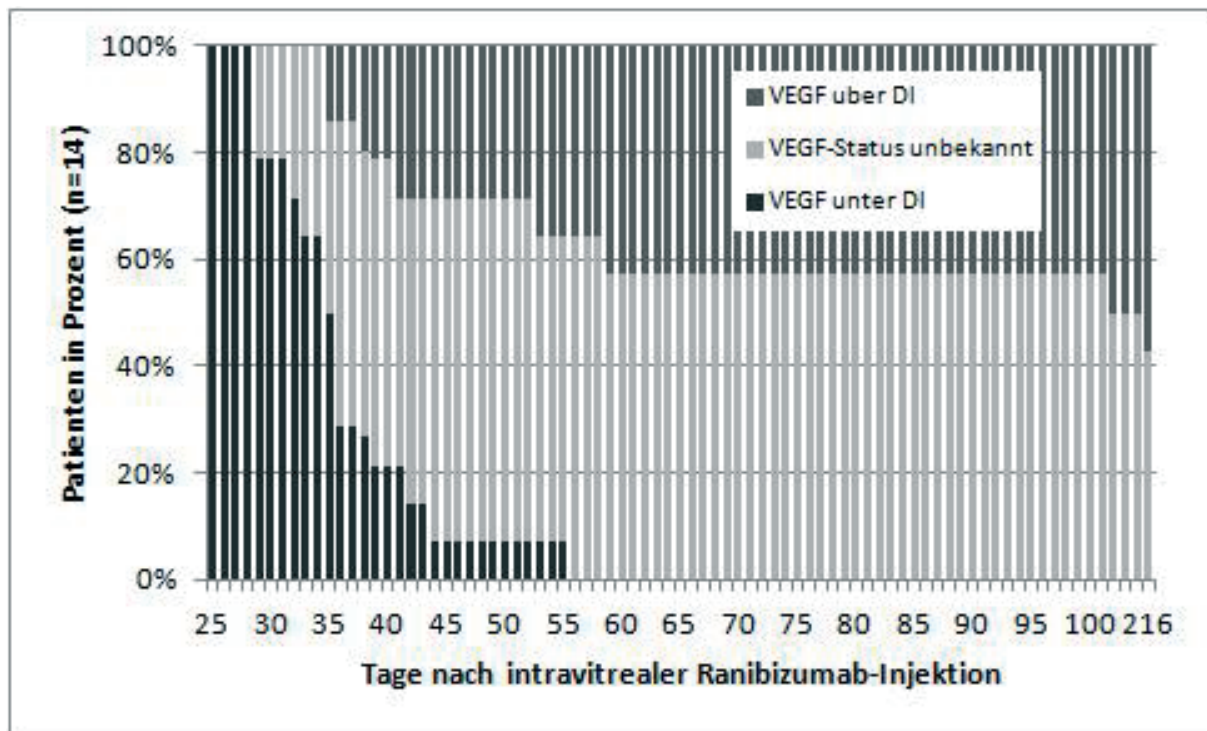


Abbildung 10: Stapelbalkendiagramm für den Prozentanteil der DME-Patienten mit VEGF-Werten oberhalb oder unterhalb des Detektionslimits für Tag 25 bis 216 nach intravitrealer Ranibizumab-Injektion

Die tatsächliche Dauer der Suppression liegt im „unbekannten“ Bereich. Der Charakter der Studie erlaubte keine frei festgesetzten Zeitspannen für die Injektionen. Die Daten wurden auf der Basis der generellen Variabilität der Reinjektionsdaten generiert. VEGF= *vascular endothelial growth factor*, DI=Detektionslimit

Aus diesen gesammelten Daten wurde das Intervall in Tagen bestimmt, bei dem VEGF in der Vorderkammer vollständig supprimiert war. Der Zeitraum, in dem Ranibizumab-Spritzen sicher zu einer Suppression der VEGF-Level in der Vorderkammerflüssigkeit aller DME-Patienten führt, beträgt 28 Tage.

4.2.3 VEGF und andere Zytokine im Plasma

Bei der Messung der Plasmaproben wurde festgestellt, dass sich die Plasma-VEGF-Level nicht statistisch signifikant von denen der Kontrollgruppe unterscheiden (Mann-Whitney-Test $p=0,0547$ $n=4-23$). Die Messung weiterer Zytokine im Plasma ergab, dass IL-1 β , IL-17, IL-4, IL-10, IFN- γ und TNF- α nicht nachweisbar waren. Die Spiegel von IL-6, IL-8, MCP-1, VCAM-1, ICAM-1 und CRP unterschieden sich nicht zwischen der Kontrollgruppe und der Diabetiker-Gruppe.

5. Diskussion

5.1 Altersabhängige Makuladegeneration

5.1.1 VEGF in der Vorderkammer

In der vorliegenden Arbeit wurden die Analyte in Vorderkammerproben gemessen. Vorderkammerproben sind im Vergleich zu Proben aus dem Glaskörper unkomplizierter und risikoärmer zu gewinnen. Korrelationen von VEGF-Leveln im Glaskörper und in der Vorderkammer bei retinalen Erkrankungen konnten in mehreren Untersuchungen nachgewiesen werden (Bakri u. a., 2007; Funatsu u. a., 2005; Noma u. a., 2008). Für andere Zytokine, beispielsweise verschiedene Interleukine, konnten diese Korrelationen auch festgestellt werden (Funatsu u. a., 2005; Noma u. a., 2008, 2010; Pollreis u. a., 2013). So kann angenommen werden, dass die in dieser Arbeit im Kammerwasser gemessenen Zytokinspiegel das Geschehen im Glaskörper angemessen widerspiegeln.

Intravitreale Injektionen mit Ranibizumab gelten heute als Standard in der Behandlung der exsudativen Form der AMD. Es existieren zwar zahlreiche Studien über die Morphologie und Funktion der Retina unter Ranibizumab-Therapie und ihre Beurteilung anhand z.B. von OCT-Aufnahmen, aber nur wenige Studien haben sich mit dem eigentlichen Zielobjekt, nämlich den VEGF-Leveln im Auge im Rahmen der Therapie, beschäftigt (Bakri u. a., 2007; Funk u. a., 2009; Sawada u. a., 2010). Auch die Studien im Zusammenhang mit der Zulassung von Lucentis® analysieren nicht die VEGF-Level, sondern messen die lokalen bzw. systemischen Ranibizumabkonzentrationen und werten die Visusveränderungen unter Therapie aus. In der vorliegenden Arbeit wurden okuläre und systemische VEGF-Werte untersucht und es wurde darüber hinaus die Entwicklung der VEGF-Level im menschlichen Auge in der Langzeitbetrachtung analysiert. Es existiert zwar eine Studie, in der VEGF- bzw. andere Zytokin-Spiegel im Auge unter der Behandlung mit intravitrealen Ranibizumab-Spritzen über einen Zeitraum von maximal zwölf Monaten gemessen wurden (Funk u. a., 2009), aber es sind bislang keine Studien bekannt, in denen die Veränderungen von VEGF- und anderen Zytokinleveln in der Vorderkammer und im Plasma von AMD-Patienten wie hier über einen Zeitraum von bis zu drei Jahren ausgewertet wurden. Innerhalb dieser Zeit kamen die Patienten ca. alle vier Wochen zur Behandlung bzw. zu einer Kontrolluntersuchung in das Zentrum für Augenheilkunde der Universitätsklinik Köln. Im Behandlungszeitraum zeigte sich, dass die Ranibizumab-Spritzen zu einer Senkung der VEGF-Spiegel in der

Vorderkammerflüssigkeit führten. VEGF war bei allen Patienten mindestens 28 Tage lang vollständig supprimiert, die mittlere Suppressionszeit liegt bei 37,8 Tagen. Bei manchen Patienten dauerte die Suppression sogar 49 Tage an. Die Suppressionszeiten sind individuell konstant. Lediglich bei zwei Patienten wurden einmalig VEGF-Werte über dem Detektionslimit gemessen und zwar zu einem Zeitpunkt, bei dem ansonsten suppressierte VEGF-Level bei ihnen festgestellt wurden. Bei 90% der Patienten wird VEGF in der Vorderkammer für die Dauer von 29 Tagen supprimiert, bei 75% der Patienten liegt die Dauer bei 33 Tagen. Die durchschnittliche Suppressionsdauer ist bei Patienten, die ein Rezidiv erleiden und bei denen, die eine persistierende Aktivität aufweisen, ähnlich. Unterschiedliche Suppressionszeiten können folglich kein Erklärungsgrund für das Auftreten von Rezidiven oder Persistenzen sein. Die Vermutung liegt nahe, dass bei diesen Krankheitsverläufen neben VEGF-Leveln noch andere Faktoren eine Rolle spielen.

Studien an Affen und Kaninchen haben gezeigt, dass die Halbwertszeit von intravitreal verabreichtem Ranibizumab ca. 3 Tage beträgt (Gaudreault u. a., 2005, 2007). Beim Menschen liegt die Eliminationshalbwertszeit von 0,5 mg Ranibizumab aus dem Glaskörper bei ca. neun Tagen bzw. aus dem Kammerwasser bei ca. sieben Tagen (Gervasini, 2009; Krohne u. a., 2012). Ausgehend von diesen Studien wurde durch Modellrechnungen die Dauer der Suppression von VEGF nach intravitrealer Injektion von Ranibizumab (0,3 bis 0,5 mg) bei Menschen auf vier Wochen geschätzt (Gaudreault u. a., 2007). Diese Zeitspanne stimmt gut mit den in dieser Arbeit gefundenen Suppressionszeiten überein. Wird die vollständige Suppression von okulärem VEGF angestrebt, so kann aufgrund der hier empirisch gewonnenen Daten beim Menschen ein Behandlungsintervall mit 0,5 mg intravitreal zu verabreichendem Ranibizumab alle 28 Tage empfohlen werden. Die Dauer der Suppression von VEGF scheint nicht in Abhängigkeit vom Krankheitsverlauf zu variieren. Das bedeutet, dass die Suppressionsdauer sowohl für Patienten, die persistierende Krankheitsgeschehen aufweisen, als auch für Patienten, die häufiger Rezidive erleiden und für diejenigen Patienten, bei denen sich das Ödem nach der Spritzenserie zurückbildet, ähnlich ist. Anhand von Vorderkammerproben, die während des Behandlungsverlaufs genommen werden würden und in denen die VEGF-Konzentrationen gemessen werden würden, könnte ein individuelles Therapieintervall für jeden Patienten bestimmt werden. So könnte für jeden einzelnen Patienten das für ihn optimale Spritzenintervall, das zu einer sicheren VEGF-Suppression führt, festgelegt werden.

Während der Suppression von VEGF wurden keine Rezidive festgestellt. Daher scheint das Vorhandensein von VEGF Voraussetzung für das Wiederauftreten der CNV-Aktivität zu sein.

Ungeachtet der vollständigen Suppression von VEGF litten einige Patienten an persistierenden Ödemen. Die durchschnittlichen Suppressionszeiten bei Patienten mit Rezidiven und bei Patienten mit persistierendem Ödem waren gleich, sodass eine persistierende Aktivität nicht mit einer kürzeren Suppressionsdauer von VEGF im Auge erklärt werden kann. Andere Faktoren müssen hier eine Rolle spielen. Interessanterweise scheint auch kein Zusammenhang zwischen der Anzahl der erlittenen Rezidive innerhalb von zwei Jahren und der individuellen Suppressionszeit zu bestehen. Selbst zur Suppressionszeit von Patienten, die im Anschluss bis zu sechs Monaten und sogar bis zu neun Monaten „trocken“ waren, besteht kein Unterschied. Zudem waren die absoluten VEGF-Werte zum Zeitpunkt eines Rezidivs statistisch nicht signifikant höher als die Ausgangswerte. Möglicherweise ist zwar das lösliche VEGF von Ranibizumab gebunden worden und somit in der Vorderkammerflüssigkeit nicht mehr messbar, aber gewebegebundenes VEGF führt weiterhin zur Angiogenese und Aufrechterhaltung der CNV und somit zu einer Persistenz des Krankheitsgeschehens. Es ist bekannt, dass sich die verschiedenen Isoformen von VEGF in ihrer Löslichkeit unterscheiden. Einige sind frei löslich, andere sind matrixgebunden und andere haben intermediäre Eigenschaften, wobei matrixgebundenes VEGF ebenso eine Bioaktivität aufweist (Park u. a., 1993; Stalmans, 2005).

Die VEGF-Werte vor jeder Spritzenserie waren für jeden Patienten relativ stabil. Auch in der Langzeitbeobachtung, d.h. nach zwölf intravitrealen Ranibizumab-Injektionen, variierten die Werte weder signifikant nach oben noch nach unten. Anzeichen für einen Rebound-Effekt konnten nicht gesehen werden. Die VEGF-Spiegel stiegen nach dem Absetzen des Ranibizumabs nach der 3er Spritzenserie nicht in überschießendem Maße an und es trat auch keine drastische Verschlechterung des ursprünglichen Makulaödems auf. Auf der Basis der hier erhobenen Daten sollte ein Therapieschema mit vierwöchentlichen Injektionen zu einer adäquaten VEGF-Inhibition führen. Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits aufzeigen, dass morphologische Rezidive (SD-OCT) einige Zeit nach dem Ende der VEGF-Suppression, nämlich nach ca. 93 Tagen, aber vor dem funktionellen Rezidiv (Sehschärfeverlust), das nach durchschnittlich 114,3 Tagen (SD 81,4, Bereich 57-398 Tage, $p=0,026$, Wilcoxon-Test) festzustellen war, auftreten (Muether u. a., 2012). Demnach sollte ein sechswöchiges Behandlungsintervall morphologische und funktionelle Rezidive verhindern können, wenngleich VEGF nicht mehr supprimiert sein wird. Die Daten erklären auch, weshalb

Injektionen alle drei Monate in funktionellen Rezidiven mit schlechteren Visusergebnissen resultieren (Regillo u. a., 2008), da hier das Therapieintervall zu groß gewählt ist. Rezidive mit Sehschärfeverlust sollten vermieden werden. Aflibercept bzw. „VEGF trap“ ist ein neuer VEGF-Inhibitor, der alle VEGF-A-Isoformen und zusätzlich PlGF bindet. Die Ergebnisse in den „VEGF Trap: Investigation of Efficacy and Safety in Wet AMD 1 and 2 trials“ zeigten, dass ein achtwöchiges Behandlungsschema der monatlichen Behandlung mit Ranibizumab nicht nachsteht (Ohr, Kaiser, 2012). Ob die intravitreale Ranibizumab-Therapie im achtwöchigen Rhythmus genauso effektiv ist, wurde nicht getestet. Es besteht die Möglichkeit, dass Rezidive bei einem Behandlungsintervall von acht Wochen noch nicht auftreten, obwohl VEGF nicht mehr supprimiert ist. In diesem Zusammenhang muss allerdings der Umstand berücksichtigt werden, dass die Kontrolluntersuchungen am Kölner Zentrum für Augenheilkunde in der Regel im monatlichen Intervall durchgeführt wurden. Es ist möglich, dass das morphologische bzw. das funktionelle Rezidiv zu einem früheren Zeitpunkt auftritt, als es aus der Kalkulation der vorliegenden Daten hervorgeht. Rezidive, die wenige Tage nach einer Kontrolluntersuchung auftreten, werden erst bei der nächsten Kontrolle einen Monat später festgestellt, sodass die Zeitspanne bis zum Auftreten eines Rezidivs in Wahrheit kürzer als angenommen sein könnte. Dies muss beachtet werden, wenn sichere Reinjektionsintervalle für den einzelnen Patienten angestrebt werden. Falls eine kontinuierliche Suppression von VEGF bei 90% der Patienten mit exsudativer AMD beabsichtigt ist, sollten die Ranibizumab-Injektionen innerhalb von jeweils 29 Tagen oder weniger erfolgen. Ein anderer Aspekt müsste hierbei in der Folge aber berücksichtigt werden, nämlich eine mögliche Tachyphylaxie gegenüber Anti-VEGF-Medikamenten. Es wäre möglich, dass die Wirkung von Ranibizumab nach der mehrfachen Applikation in kurzen Abständen gemindert wird. Einige Studien legen dar, dass der Effekt von Ranibizumab, die Dicke der Retina zu reduzieren, mit der Zeit abgeschwächt wird (Keane u. a., 2008, 2009). Auch für Bevacizumab gibt es ähnliche Beobachtungen einer Tachyphylaxie (Forooghian u. a., 2009; Schaal u. a., 2008). Keane u.a. nehmen an, dass Patienten, die Zeichen einer Tachyphylaxie bezüglich Ranibizumab zeigen, von einer Behandlung mit Bevacizumab profitieren könnten (und *vice versa*). Alternativ könne auch eine Pause in der Behandlung eingelegt oder höhere Dosen verabreicht werden (Keane u. a., 2011). Allerdings hat die sogenannte HARBOR-Studie jüngst ergeben, dass erhöhte Dosen Ranibizumab (2 mg) keinen Vorteil gegenüber der üblichen Dosis von 0,5 mg Ranibizumab für den Patienten haben (Busbee u. a., 2013). Bei den Messungen der hier vorliegenden Arbeit wurde keine Abschwächung der VEGF-Suppression selbst nach intravitrealen Ranibizumab-Injektionen im

zweistelligen Bereich beobachtet, sodass die Dosis von 0,5 mg auch in der Langzeittherapie ausreichend wirksam scheint. Diese Daten stützen die Ergebnisse der HARBOR-Studie. Über die Retinadicke kann allerdings an dieser Stelle keine Aussage getroffen werden. Dieser Aspekt könnte in zukünftigen Untersuchungen weiter beleuchtet werden.

Außerdem wurde bei einem AMD-Patienten im Rahmen einer Katarakt-Operation eine Vorderkammerprobe genommen (Daten im Ergebnisteil nicht dargestellt). Der gemessene VEGF-Wert (87 pg/ml) war annähernd so hoch wie der vor Therapiebeginn gemessene Anfangswert (102 pg/ml), obwohl das Auge zu dieser Zeit kein aktives Krankheitsgeschehen, d.h. kein Ödem, zeigte und dieser Zustand auch noch mindestens sieben Monate andauerte. Auch wenn es sich hierbei um nur eine einzige Probe handelt, scheint doch, zumindest bei diesem Patienten, nicht allein ein hohes VEGF-Level kennzeichnend für eine vorliegende exsudative AMD zu sein. Zusätzliche Faktoren müssen hierbei eine Rolle spielen.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe wurde in der vorliegenden Arbeit keine signifikante Erhöhung der VEGF-Level in den Vorderkammerflüssigkeiten der AMD-Patienten festgestellt. Andere Wissenschaftler haben zwar eine derartige Erhöhung von VEGF nachweisen können, sie war aber gering (Funk u. a., 2009). In mehreren Studien konnte kein signifikanter Unterschied zwischen AMD-Patientengruppe und Kontrollgruppe hinsichtlich der VEGF-Werte in der Vorderkammerflüssigkeit bestimmt werden (Jonas, Neumaier, 2007; Jonas u. a., 2010; Roh u. a., 2009). Der Anstieg der VEGF-Level nach der Therapie mit Ranibizumab ist ein physiologischer Vorgang. Auch wenn CNV-Läsionen von Veränderungen der VEGF-Konzentrationen begleitet werden, scheint die im Vergleich zum gesamten Augapfel relativ kleine Läsion bei der AMD keinen statistisch signifikanten Effekt auf die VEGF-Spiegel in der Kammerflüssigkeit haben zu können (Roh u. a., 2009). Der Unterschied der VEGF-Werte zwischen AMD-Patienten und gesunder Kontrollgruppe ist nicht groß genug, um anhand dieser Werte ein aktives Geschehen im Rahmen einer AMD bei Patienten zu erkennen (Muether u. a., 2012). Wie unsere Arbeitsgruppe herausfinden konnte, sind nur bei intermediärer trockener AMD und nicht bei neovaskulärer AMD die VEGF-Spiegel in der Vorderkammerflüssigkeit erhöht, sodass die VEGF-Level nicht direkt die Aktivität der CNV zu reflektieren scheinen (Muether u. a., 2013).

5.1.2 VEGF im Plasma

Da Thrombozyten VEGF enthalten und sie dieses bei ihrer Aktivierung durch Koagulation freisetzen (Banks u. a., 1998), wurden in dieser Arbeit VEGF, und in der Folge auch die

anderen Zytokine, im Plasma und nicht im Serum gemessen. Misst man VEGF im Serum, erhält man fälschlich erhöhte VEGF-Werte (Hyodo u. a., 1998; Webb u. a., 1998). Deshalb wird von verschiedenen Seiten die Bestimmung von VEGF im Plasma propagiert und die Messung im Serum abgelehnt (Banks u. a., 1998; Hyodo u. a., 1998; Webb u. a., 1998; Wynendaele u. a., 1999). Im Gegensatz zu anderen Studien (Lip u. a., 2001; Tsai u. a., 2006) konnten im Plasma bezüglich der VEGF-Werte keine signifikanten Unterschiede zwischen der AMD-Patientengruppe und der gesunden Kontrollgruppe festgestellt werden. Eine systemische Erhöhung der VEGF-Werte lag nicht vor. Allerdings sanken interessanterweise unter der intravitrealen Anti-VEGF-Therapie auch die Plasma-VEGF-Spiegel. Dabei scheint es keine Rolle zu spielen, wie viele Spritzen mit Ranibizumab ein Patient bereits intravitreal erhalten hat oder wie lange die letzte Spritze zurückliegt. Vor allem zum Therapiezeitpunkt „trocken“ liegen die individuellen Plasma-VEGF-Werte deutlich unterhalb der Anfangswerte. Sogar bei Patienten, bei denen die letzte intravitreale Lucentis®-Spritze bereits 5-11 Monate zurückliegt, ist dieser Unterschied zu verzeichnen. Die VEGF-Plasmakonzentrationen der AMD-Patienten liegen schließlich während der Therapie mit Ranibizumab statistisch signifikant unterhalb der VEGF-Plasmaspiegel der gesunden Kontrollgruppe. Auch wenn in mehreren Studien nur bei der Behandlung mit Bevacizumab und nicht mit Ranibizumab ein Absinken der systemischen VEGF-Spiegel festgestellt wurde (Carneiro u. a., 2012; Machalińska u. a., 2011; Zehetner u. a., 2013), muss hierbei beachtet werden, dass die Werte nur nach einer oder maximal drei intravitrealen Injektionen erhoben wurden. In der IVAN-Studie (*alternative treatments to Inhibit VEGF in Age-related choroidal Neovascularization*), in der die systemischen Werte nach einem Jahr erhoben wurden, konnte sowohl bei der Therapie mit Bevacizumab als auch mit Ranibizumab ein Absinken der systemischen VEGF-Werte beobachtet werden (Chakravarthy u. a., 2012). Auch Meyer-Rüsenberg *et al.* konnten eine deutliche Abnahme der VEGF-Plasmalevel bei Patienten mit feuchter AMD unter Ranibizumab-Therapie feststellen (Meyer-Rüsenberg, 2010). Ranibizumab wurde bislang gegenüber Bevacizumab eine größere Sicherheit bezüglich systemischer Auswirkungen zugestanden. Es wurde vermutet, dass das Antikörper-Fragment Ranibizumab im Vergleich zum kompletten IgG-Molekül Bevacizumab auf Grund seiner geringeren Größe eine schnellere retinale Clearance und somit eine verkürzte Diffusion in den systemischen Kreislauf erfährt (Heiduschka u. a., 2007; Zehetner u. a., 2013). Zudem liegt die systemische Halbwertszeit des Fab-Moleküls bei ungefähr nur zwei Stunden, während die des kompletten Antikörpers ca. drei Wochen beträgt (Reff u. a., 2002). Es muss folglich überlegt werden, ob nicht auch unter der zumindest längerfristigen Therapie mit Ranibizumab VEGF systemisch

inhibiert wird und somit nicht nur lokale, im Auge stattfindende Prozesse ablaufen, sondern auch systemische Auswirkungen, wie z.B. Hypertonie, Proteinurie, Thrombembolien und Hämorrhagien (Apte u. a., 2007; Kabbinavar u. a., 2003; Schmucker u. a., 2010), stattfinden können. In der MARINA 2006 (*Minimally classic/occult trial of the Anti-VEGF antibody Ranibizumab In the treatment of Neovascular AMD*)-, PIER 2008 (*Phase IIIb, Multi-center, Randomized, Double-Masked, Sham Injection-Controlled Study of Efficacy and Safety of Ranibizumab in Subjects with Subfoveal CNV with or without Classic CNV secondary to AMD*)- und ANCHOR 2009 (*ANti-VEGF Antibody for the Treatment of Predominantly Classic CHORoidal Neovascularization in AMD*)-Studie wurden bei Patienten, die intravitreal mit Ranibizumab behandelt wurden, Myokardinfarkte, Schlaganfälle und schwerwiegende nichtokuläre Blutungen festgestellt. Allerdings konnte aufgrund der jeweiligen Studiendesigns keine Aussage darüber getroffen werden, ob diese Ereignisse lediglich durch Zufall oder durch Ranibizumab bedingt waren (Schmucker u. a., 2010). VEGF wird auch eine neuroprotektive Funktion zugesprochen. VEGF-A kann anti-apoptotisch auf experimentell geschädigte retinale Neurone wirken. Unter ischämischen Bedingungen wirkt es neuroprotektiv, indem es den Blutfluss erhöht oder aber auf direktem, vom Blutfluss unabhängigen, Weg (Nishijima u. a., 2007), z.B. durch die erhöhte Expression von VEGFR-2 (Jin u. a., 2000), regulierend eingreift. Interessanterweise ist auch das Überleben gesunder retinaler Ganglionzellen von VEGF-A abhängig (Nishijima u. a., 2007), sowie auch normale Gefäße und Neurone des zentralen Nervensystems zu ihrer Erhaltung auf VEGF-A angewiesen sind (Sun u. a., 2003). Einerseits können durch eine Anti-VEGF-Therapie Ödeme, Hämorrhagien und Neovaskularisationen eingedämmt werden, andererseits könnten durch diese Behandlung aber auch Neurone gefährdet werden. Dieser Aspekt sollte auch bei einer okulären Anti-VEGF-Therapie bedacht werden, gerade wenn sie als Langzeitbehandlung durchgeführt wird. Weitere Auswertungen zu systemischen Langzeitauswirkungen sollten vorgenommen werden. In der vorliegenden Arbeit konnte wegen teilweise zu geringer Probenanzahl in den Untergruppen keine sichere Unterscheidung zwischen VEGF-Leveln zu Anfang der Therapie und zu späteren Therapiezeitpunkten getroffen werden. Die Analyse weiterer Blutproben zur Erhöhung der Stichprobenzahl wird derzeit vorgenommen.

5.1.3 Andere Zytokine in der Vorderkammer

Einige Studien haben Zytokine, die bei Entzündungsprozessen eine wichtige Rolle spielen, im Auge von Patienten mit AMD untersucht.

So konnte festgestellt werden, dass MCP-1 aus dem retinalen Pigmentepithel freigesetzt wird (Crane u. a., 2000; Forrester, 2003). Es wirkt generell chemotaktisch auf Monozyten, die in der frühen Phase von Entzündungsvorgängen und der Angiogenese eine wichtige Rolle spielen (Deshmane u. a., 2009). Monozyten sind zur Phagozytose und Antigenpräsentation befähigt, zudem differenzieren sie sich zu Makrophagen. In der vorliegenden Arbeit waren die MCP-1-Werte in den Vorderkammerproben der AMD-Patienten im Vergleich zur Kontrolle deutlich erhöht. Eine mögliche Erklärung, weshalb die MCP-1-Level erhöht sind, liefert eine Studie von Austin *et al.*: Mit AMD ist der HTRA (*high-temperature requirement serine protease*)-1-Polymorphismus eng verbunden. HTRA-1 ist in der Makularegion vieler AMD-Patienten hochreguliert. Das natürliche Substrat für diese Protease ist u.a. Fibronektin, das sich auch in der Bruchschen Membran und bei AMD-Patienten in erhöhter Menge, auch in Drusen, findet. HTRA-1 spaltet Fibronektin in Fibronektin-Fragmente. Diese Fragmente wiederum stimulieren die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6 und auch MCP-1. Die Autoren vermuteten weiterhin, dass residente Makrophagen (Mikroglia) durch eine erhöhte Expression von MCP-1 angelockt werden und zum Abbau des RPE und der Bruchschen Membran beitragen (Austin u. a., 2009). In der histologischen Untersuchung von subfovealen neovaskulären Membranen konnten Makrophagen in den Regionen gefunden werden, die eine Atrophie des RPE, den Zusammenbruch der Bruchschen Membran und choroidale Neovaskularisationen zeigten (Patel, Chan, 2008). Yang und Kollegen konnten darlegen, dass MCP-1-aktivierte Makrophagen im RPE über einen kalziumabhängigen Signalweg eine Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) bedingen, die wiederum Apoptose des RPE induzieren (Yang u. a., 2011). Zudem scheinen erhöhte Level von MCP-1 zu einer weitergehenden Schädigung der Retina zu führen. So konnte ein Zusammenhang zwischen MCP-1 und der Apoptose von Photorezeptoren bei einer Netzhautablösung gefunden werden. Die Zytotoxizität von MCP-1 ist auch hier in einer Aktivierung von Makrophagen und ihrer Produktion von oxidativem Stress bedingt (Nakazawa u. a., 2007). ROS entstehen in den RPE-Zellen auch durch die Lipidperoxidation der phagozytierten Stäbchen-Außensegmente, was wiederum die Expression von MCP-1 seitens des RPE induziert (Higgins u. a., 2003), und intensive Lichteinstrahlung sowie hohe Sauerstoffspannung in der Makularegion tragen zur Entstehung von oxidativem Stress bei (Cai u. a., 2000). Folgender Pathomechanismus könnte der Apoptose des RPE bzw. der Photorezeptoren zugrunde liegen: MCP-1 aktiviert Monozyten. In RPE-Zellen erhöhen diese aktivierten Monozyten Calcium²⁺-Level; erhöhte Calciumlevel wiederum bedingen eine Produktion von ROS (Yang u. a., 2011). Zu hohe Kalziumlevel bewirken bei den

Mitochondrien die Öffnung der sogenannten „permeability transition pore“, einer Proteinpore, die sich aus Proteinen der inneren und äußeren mitochondrialen Membranen zusammensetzt und für gelöste Stoffe <1500 Dalton durchlässig ist. Mit der Öffnung der Pore ist die Freisetzung von Cytochrom C verbunden. Cytochrom C führt als proapoptotischer Faktor zum programmierten Zelltod (Loeffler, Kroemer, 2000). Außerdem wird das Öffnen der Pore von einer massiven Freisetzung von ROS, die u.a. als Nebenprodukte der Atmungskette entstehen, begleitet (Green, Reed, 1998; Grijalba u. a., 1999). Es wird propagiert, dass ROS wiederum die Mitochondrien selbst angreifen, indem sie die mitochondriale DNA schädigen. Dies führe zu einer Dysfunktion der Atmungskette und verminderter Bereitstellung von Energie. In der Folge käme es zu Schäden und Apoptose des RPE (Liang, Godley, 2003). Einen weiteren Zusammenhang zwischen AMD und oxidativem Stress haben Weismann und Kollegen herausgefunden (Weismann u. a., 2011): Ein zuverlässiger Marker für oxidativen Stress ist Malondialdehyd (MDA). Es entsteht bei der Lipidperoxidation von Membranphospholipiden. MDA wurde in Drusen von AMD-Patienten gefunden (Schutt u. a., 2003) und MDA-modifizierte Proteine bewirken Entzündungserscheinungen und werden vom angeborenen Immunsystem erkannt (Shanmugam u. a., 2008; Thiele u. a., 2004). Weismann u.a. fanden heraus, dass Komplementfaktor H (CFH) in der Lage ist, MDA zu binden. MDA-Epitope finden sich z.B. auch auf nekrotischen und apoptotischen RPE-Zellen. Wenn CFH an Oberflächen bindet, die MDA tragen, inaktiviert es Komplement, indem es zur Bildung des inaktiven Komplement-3b-Fragmentes (iC3b) beiträgt und begünstigt so ein anti-entzündliches Milieu. Weiterhin induziert MDA in RPE-Zellen die Sekretion von IL-8, das eine wichtige Rolle im entzündungsassoziierten Pathogeneseaspekt der AMD spielt (s.u.). In Anwesenheit von CFH wurde diese Sekretion inhibiert (Weismann u. a., 2011). Bei AMD-Patienten liegt nun aber häufig der CFH-Polymorphismus H402 vor, der die Fähigkeit von CFH an MDA zu binden, drastisch reduziert. So werden die MDA-induzierten proinflammatorischen Effekte unzureichend blockiert und ein vollständiger Schutz vor oxidativem Stress besteht nicht mehr (Weismann u. a., 2011). Darüber hinaus induziert MCP-1 über eine Hochregulierung von hypoxia-inducible-factor-1 α (HIF-1 α) die VEGF-A-Expression in humanen Aorten-Endothelzellen und spielt somit eine wichtige Rolle in der VEGF-A-induzierten Angiogenese (Hong u. a., 2005). Yamada u.a. haben zudem herausgefunden, dass wiederum auch VEGF die MCP-1-messenger-RNS-Level in Endothelzellen erhöht. Die durch VEGF induzierte Gefäßbildung und vaskuläre Permeabilitätssteigerung wurde in Experimenten inhibiert, sobald ein MCP-1-Antikörper angewendet wurde (Yamada u. a., 2003). Es lässt sich schlussfolgern, dass MCP-1 bei der

VEGF-induzierten Angiogenese und auch bei der durch VEGF bedingten akuten vaskulären Leckage mitwirkt. Generell kann ein Zusammenhang zwischen erhöhten MCP-1-Leveln im Vorderkammerwasser und AMD gesehen werden. Maximale MCP-1-Level konnten in der Phase der aktiven CNV festgestellt werden, sodass MCP-1 als Indikator für die angiogene Phase bei AMD dienen könnte und gleichzeitig Zielmolekül in der Therapie der exsudativen AMD werden könnte (Kramer u. a., 2011).

Jonas et al. zeigten 2010 bzw. 2012, dass bei Patienten mit exsudativer AMD die Werte von MCP-1, ICAM-1, VCAM-1, IL-6 und IL-8 im Vergleich zu einer Kontrollgruppe im Vorderkammerwasser erhöht waren (Jonas u. a., 2010, 2012). Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. RPE-Zellen sind in der Lage, IL-6 (Benson u. a., 1992) und IL-8 zu sezernieren (Holtkamp u. a., 1998). Als Antwort auf ROS in Photorezeptoraußensegmenten oder entzündungsbedingte Schädigungen wird IL-8 vom RPE in vermehrtem Maße exprimiert (Higgins u. a., 2003; Kanda u. a., 2008), dazu kann es u.a. von Makrophagen, Neutrophilen und Endothelzellen als Antwort auf inflammatorische Stimuli produziert werden (Taub, Oppenheim, 1994). IL-8 lockt im Entzündungsgeschehen chemotaktisch vor allem neutrophile Granulozyten an (Baggiolini, Clark-Lewis, 1992). Außerdem bewirkt es eine VEGF-unabhängige Angiogenese (Brat u. a., 2005; Mizukami u. a., 2005), indem es u.a. die Proliferation von Endothelzellen und die Organisation von Kapillargefäßen fördert (Brat u. a., 2005; Li u. a., 2003). Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass IL-8 die Produktion der Matrixmetalloproteinasen (MMP)-2 und -9 hochreguliert. Diese MMP bauen Extrazellulärmatrix ab, ein Vorgang, der wichtig für Endothelzellmigration und -organisation und schließlich auch für die Angiogenese ist (Li u. a., 2003). In Anwesenheit von IL-8 wurde Apoptose von Endothelzellen verhindert und die Expression von antiapoptotischen Genen verstärkt. So fungiert IL-8 als Überlebensfaktor für Endothelzellen und wirkt an der Angiogenese mit (Li u. a., 2003). Es ist zudem als Stimulator der Expression von Adhäsionsmolekülen bekannt. Desweiteren konnte herausgefunden werden, dass ein IL-8-Promotor-Polymorphismus, der eine erhöhte Expression von IL-8 bewirkt, mit der AMD assoziiert ist (Goverdhan u. a., 2008). IL-8 wirkt nicht nur chemotaktisch und proangiogen, sondern es ist auch beim sogenannten „Homing“ von Stammzellen zur Reparatur beschädigter Areale involviert (Kramer u. a., 2011). Die CNV wird von einigen Wissenschaftlern als Antwort auf einen Wundheilungsprozess betrachtet (Kent, Sheridan, 2003; Schlingemann, 2004). Sie stellen eine Analogie zwischen der AMD und dem Heilungsverlauf von Wunden bzw. Gewebe her. Wie das Granulationsgewebe der Haut sei die CNV durch Prozesse wie Gerinnung, Entzündung, Angiogenese und Fibrose

charakterisiert, und wie bei Hautwunden würden Wachstumsfaktoren und Zytokine exprimiert. IL-8 ist im Wundheilungsprozess involviert und fördert diesen (Rennekampff u. a., 2000). Da erhöhte IL-8-Spiegel v.a. auch bei AMD-Patienten, bei denen sich eine subretinale Narbe gebildet hat, festgestellt wurden, kann angenommen werden, dass IL-8 neben seiner frühen Funktion als Chemokin auch eine Rolle bei der späteren Narbenbildung spielt (Kramer u. a., 2011).

Das proinflammatorische Zytokin IL-6 führt, neben seiner Rolle als Lymphozyten-stimulierender Faktor und Aktivator der Akute-Phase-Proteine, indirekt zur Angiogenese, indem es die Expression von VEGF induziert (Cohen u. a., 1996). IL-6 unterhält auch Entzündungsgeschehen, indem es die Expression von CRP bewirkt (Goverdhan u. a., 2008). Izumi-Nagai u.a. konnten zeigen, dass eine laserinduzierte CNV in Mäusen die Expression von IL-6 im RPE-Choroidea-Komplex stimuliert und dass die Blockade des IL-6-Rezeptor zu verminderter CNV führt. Außerdem stellten sie fest, dass die Blockade des IL-6-Rezeptors eine Suppression von Entzündungs- bzw. CNV-assoziierten Molekülen wie MCP-1, ICAM-1 und VEGF bedingt. Die ebenfalls zu verzeichnende Suppression einer Infiltration mit Makrophagen innerhalb der CNV erklärten die Autoren damit, dass in diesem Fall weder die MCP-1 vermittelte Migration noch die ICAM-1 abhängige Adhäsion von Makrophagen stattfinden kann. In der Folge bleibe auch die durch Makrophagen vermittelte Sekretion von VEGF aus. Eine therapeutische Blockade des IL-6-Rezeptors könnte somit nicht nur bezüglich der okulären Verhältnisse von Vorteil sein und eine entzündliche Neovaskularisation verhindern, sondern sie könnte auch auf systemischer Ebene durch die dann erfolgende Suppression von CRP positive Auswirkungen im Hinblick auf eine Prävention von AMD haben (Izumi-Nagai u. a., 2007). Auch andere Wissenschaftler postulieren einen Zusammenhang zwischen IL-6- und IL-8-Leveln in der Vorderkammerflüssigkeit und der Größe bzw. Aktivität der CNV (Roh u. a., 2009). Eine weitere Verbindung zwischen oxidativem Stress und Entzündungs- bzw. Autoimmunreaktionen in der Pathogenese der AMD konnten Wu u.a. aufzeigen, indem sie nachwiesen, dass Wasserstoffperoxid die Produktion von IL-6 in humanen RPE-Zellen stimuliert (Wu u. a., 2010). Auf diese vielfältigen Weisen können die Interleukine 6 und 8 Einfluss auf die Entstehung und Aufrechterhaltung der exsudativen Form der AMD nehmen und die hier gemessenen erhöhten Werte stehen mit diesen Erklärungsansätzen zur Pathogenese in Einklang.

Jonas *et al.* postulierten, dass u.a. VCAM-1 und ICAM-1 eine wichtige Rolle in der Entstehung der AMD spielen müssen, da sie bei Patienten in erhöhtem Maße gemessen

wurden, wohingegen die VEGF-Spiegel im Vergleich zu Gesunden nicht erhöht waren (Jonas u. a., 2010). ICAM-1 vermittelt bei Entzündungsprozessen die Bindung von Leukozyten an Endothelzellen, sodass diese ins Gewebe transmigrieren können. Die gleiche Funktion erfüllt VCAM-1 in vaskulärem Endothel. Zelladhäsionsmoleküle wurden in subretinalen Läsionen bei AMD-Patienten gefunden (Heidenkummer, Kampik, 1995). ICAM-1 ist im RPE-Choroidea-Komplex mit CNV erhöht (Shen u. a., 1998); eine Inhibierung von ICAM-1 in Mäusen führt zu einer Verringerung der CNV (Sakurai u. a., 2003). Bei menschlichen Spenderaugen wurde zudem nachgewiesen, dass ICAM-1 vermehrt in der Makula, und weniger in der peripheren Choroidea, zu finden ist. Dies legt nahe, dass die Makula einer erhöhten Anzahl von Leukozyten ausgesetzt ist (Mullins u. a., 2006). Eine mögliche Folge könnte die Schädigung kapillärer Endothelzellen durch die Adhäsion von Neutrophilen und Monozyten sein (Peri u. a., 1990; Skeie u. a., 2010). Außerdem scheinen Makrophagen eine CNV durch diverse Prozesse, wie die Expression von MMPs und der damit verbundenen Schädigung der Bruchschens Membran oder den durch ihre Transmigration verursachten Endothelzellschaden und eine anschließende Hypoperfusion der Choroidea zu begünstigen (Skeie, Mullins, 2009). Jonas u.a. konnten einen Zusammenhang zwischen der Größe eines Makulaödems und erhöhten ICAM-1-Spiegeln im Vorderkammerwasser aufzeigen (Jonas u. a., 2012). Auch der Komplementfaktor C5a bewirkt eine Expression von ICAM-1, und zwar in choroidalen Endothelzellen (Skeie u. a., 2010). Da bei einigen AMD-Patienten durch den Y402H-CFH-Polymorphismus die inhibierende Wirkung des Komplementfaktor H gestört ist, kann es bei diesen so zu einer gesteigerten ICAM-1-Produktion kommen. Zudem fanden Yoshida u.a. (Yoshida u. a., 2003) heraus, dass aktivierte Monozyten humane RPE-Zellen zur Produktion von reaktiven Sauerstoffmetaboliten anregen und Apoptose von RPE-Zellen, über die Aktivierung der Caspase-3, induzieren. Für beide Vorgänge ist ein Zellkontakt zwischen den Monozyten und den retinalen Pigmentepithelzellen notwendig. Dieser Zell- Zell-Kontakt wird teilweise durch ICAM-1 hergestellt. Eine ICAM-1-Blockade verhindert signifikant die Apoptose der RPE-Zellen, wohingegen allerdings eine VCAM-1-Blockade Apoptose nicht abwenden konnte.

VCAM-1 findet sich auf dem Endothel von retinalen Gefäßen (Noda u. a., 2008a) und den Gefäßen der Choroidea und auch in den Gefäßen von CNV-Läsionen (Noda u. a., 2008b). Eine Inhibierung von VCAM-1 führt zu einer Reduktion der Größe der CNV, zu verringerter Leckage in der Fluoreszenzangiographie und reduzierter Makrophagenansammlung in der CNV-Läsion (Noda u. a., 2008b). Desweiteren wird durch die Blockade von VCAM-1 die Expression von ICAM-1, TNF- α und MCP-1 in den choroidalen Geweben mit CNV reduziert.

Da ICAM-1 auch für die Makrophagenrekrutierung verantwortlich zu sein scheint, sinkt die Zahl der Makrophagen weiter. Die von den Makrophagen bedingte Sekretion von TNF- α (Oh u. a., 1999) wird folglich reduziert und die TNF- α abhängige Expression von MCP-1 (Elner u. a., 1991) sinkt. Niedrige MCP-1-Spiegel führen auch zu verminderter Anlockung von Makrophagen. Die Größe der CNV-Läsion wird reduziert. Da 14 Tage nach der laserinduzierten CNV-Läsion durch eine VCAM-1-Blockade keine Reduzierung dieser mehr erreicht werden konnte, scheinen andere angiogene Mechanismen in Gang gesetzt worden zu sein (Noda u. a., 2008b). Dies führt zu der Überlegung, dass die Inhibierung mehrerer und nicht allein einzelner angiogener Faktoren in der Therapie der exsudativen AMD von Nöten ist. VCAM-1 spielt eine wichtige Rolle bei den proangiogenen Effekten von oxidativem Stress (Dong u. a., 2011): Wenn auf die ischämische Retina oxidativer Stress einwirkt, wird v.a. VCAM-1 in der Retina exprimiert. Dieser Anstieg von VCAM-1 bewirkt einen Anstieg der Expression von HIF-1-regulierten Genen, die an der Sprossung neuer Gefäße in der Retina beteiligt sind, und einen Anstieg von Leukostase. Durch letztere kommt es zu einer reduzierten kapillären Perfusion, sodass schließlich die retinale Neovaskularisation verstärkt wird. Obwohl VEGF auch zu den HIF-1-regulierten Genen zählt, wird VEGF nicht hochreguliert. Dies legt nahe, dass die Verschlimmerung von okulärer Neovaskularisation durch oxidativen Stress nicht von VEGF sondern anderen Faktoren abhängt und dass die Effekte von VCAM-1 und VEGF bezüglich okulärer Neovaskularisation unabhängig voneinander sind. Dong u.a. schlagen deshalb vor, neben VEGF-Inhibitoren auch den Einsatz von Anti-VCAM-1-Medikamenten in der Therapie von AMD zu bedenken. Die in dieser Arbeit gefundenen erhöhten Spiegel von ICAM-1 und VCAM-1 bei AMD-Patienten stehen mit diesen Theorien im Einklang.

Zwar konnten in der vorliegenden Arbeit nicht alle Zytokine auch bei Kontrollgruppen analysiert werden, dafür wurden aber die Spiegel der einzelnen Analyte im zeitlichen Verlauf und unter Lucentis-Therapie beleuchtet. Es wurde festgestellt, dass Angiogenin bei persistierenden Krankheitsgeschehen in der Vorderkammer erhöht ist. Angiogenin induziert in verschiedenen Geweben Angiogenese durch u.a. Aktivierung von vaskulären Endothelzellen und glatten Muskelzellen und durch die Beteiligung an Prozessen wie Zellmigration, Invasion, Proliferation und Bildung tubulärer Strukturen (Fett u. a., 1985; Gao, Xu, 2008; Soncin, 1992). Auch in der Choroidea bei gesunden Menschen, in Drusen und in neovaskulären Membranen bei AMD-Patienten wurde Angiogenin nachgewiesen (Skeie u. a., 2011). Erhöhte Mengen bei Persistenz deuten auf eine Beteiligung von Angiogenin an der

Bildung oder Aufrechterhaltung von CNV hin. Dieser Aspekt könnte bei möglichen neuen Therapieoptionen berücksichtigt werden.

Es zeigt sich in der vorliegenden Arbeit, dass auch der Wachstumsfaktor PDGF bei Persistenz in der Vorderkammer erhöht ist. PDGF wirkt chemotaktisch (Campochiaro, Glaser, 1985) und mitogen auf RPE-Zellen und retinale Gliazellen (Funk u. a., 2009). Es wird vom RPE exprimiert und gilt als Überlebensfaktor für Perizyten, die wiederum für die Stabilisierung von Gefäßen wichtig sind. Im Fall der AMD sind es die Gefäße der CNV, die stabilisiert werden und die Perizyten sind vermutlich auch dafür verantwortlich, dass antiangiogene Faktoren an der Penetration der Gefäße gehindert werden (Kernt u. a., 2010). Während der Entwicklung einer CNV bewirkt PDGF die Rekrutierung von Perizyten (Jo u. a., 2006; Schlingemann, 2004). Studien haben gezeigt, dass eine Blockade von PDGF retinale Angiogenese verhindern kann. Eine Kombinationstherapie mit VEGF-Inhibitoren war aber effektiver (Jo u. a., 2006). Andere Studien legten dar, dass eine alleinige Blockade von PDGF hingegen nicht ausreicht, Angiogenese zu unterdrücken, sondern dass zusätzlich auch VEGF inhibiert werden muss. Eine Kombinationstherapie von PDGF- und VEGF-Inhibitoren war wiederum auch hier effektiver bezüglich der Inhibierung der Angiogenese (Dias u. a., 2011; Jo u. a., 2006). Da in der vorliegenden Arbeit trotz der Suppression der VEGF-Spiegel persistierende Krankheitsgeschehen auftraten, kann in der Erhöhung von PDGF ein möglicher Grund für das beständige Ödem gesehen werden.

Die Arbeit zeigt zudem, dass die Angiogenese-Inhibitoren THBS-2 und Endostatin bei Rezidiven erhöht sind. Erhöhte Endostatinlevel bei neovaskulärer AMD konnten in unserer Arbeitsgruppe in früheren Experimenten bereits festgestellt werden (Muether u. a., 2013). Mehrere Autoren konnten hingegen darlegen, dass beide Faktoren bei AMD-Patienten erniedrigt sind (Bhutto u. a., 2008; Tatar u. a., 2006; Uno u. a., 2006). Endostatin reguliert antiangiogene Gene hoch und regelt angiogene Gene inklusive VEGF herunter; auf zellulärer Ebene hemmt es u.a. Endothelzellproliferation und -migration (Tatar u. a., 2006). Es inhibiert vaskuläre Leckagen auf direktem Weg (Marneros u. a., 2007) und es unterbindet VEGF-induzierte vaskuläre Permeabilität, indem es möglicherweise *tight-junction*-Proteine hochreguliert (Brankin u. a., 2005; Marneros u. a., 2007). Tatar u.a. (Tatar u. a., 2006) konnten nachweisen, dass Endostatin sowohl in Augen von Gesunden als auch von Patienten mit AMD exprimiert wird. Sie beobachteten zudem, dass die proliferative Aktivität der Endothelzellen hoch war trotz hoher Endostatinexpression. Die zusätzliche Beobachtung von hoher VEGF-Expression mit gleichzeitig hoher Endostatin-Expression in Augen mit hoher

angiogener Aktivität ließ sie schlussfolgern, dass angiogene und antiangiogene Faktoren in CNV nicht nacheinander sondern gleichzeitig agieren, bis sie schließlich ein Gleichgewicht erreichen und sich stabilisieren. Zudem konnten Ergün u.a. (Ergün u. a., 2001) zeigen, dass Endostatin nur in neu geformten Gefäßen im Rahmen pathologischer Angiogenese exprimiert wird und nicht in Gefäßen in nicht-pathologischen bzw. nicht-angiogenen Kontrollorganen. Aus diesen Funden lässt sich eine mögliche Erklärung für die hier gefundenen erhöhten Werte von Endostatin bei Rezidiven ableiten: Es sind nach der trockenen Phase nun wieder neue Gefäße gebildet worden, wodurch Endostatin exprimiert wird. Als antiangiogener Faktor tritt es in dieser Phase zusammen mit dem angiogenen Faktor VEGF auf, der bei Vorliegen von Rezidiven, wie hier gezeigt wird, nicht supprimiert ist. Andererseits ist es auch möglich, dass Endostatin in der vorangegangenen trockenen Phase hochreguliert war bzw. im Vergleich zu den möglicherweise erniedrigten Ausgangswerten nun auf normale Level angehoben wurde, sodass die CNV erfolgreich eingedämmt werden konnte. Durch andere Faktoren ist es aber zu einem Rezidiv gekommen und die zuvor hochregulierten Endostatinlevel reichen nicht mehr zur Inhibierung der Angiogenese aus. Interessanterweise stellten Tatar u.a. in humanen CNV, die eine Behandlung mit Bevacizumab erfahren hatten, neben reduzierter Expression von VEGF eine erhöhte Expression von Endostatin fest. Die VEGF-Dominanz über Endostatin war im RPE, den Gefäßen und dem Stroma von CNV, die mit Bevacizumab behandelt worden waren, signifikant niedriger im Vergleich zu Kontrollen. Möglicherweise könnte Bevacizumab selbst eine direkte verstärkende Wirkung auf die Expression von Endostatin haben (Tatar u. a., 2009). Einen ähnlichen Effekt könnte hier auch Ranibizumab auf die Endostatin-Expression haben. Außerdem erklären sie, dass Makrophagen und Entzündungszellen u.a. proteolytische Enzyme wie Matrixmetalloproteinasen sezernieren. Die Proteasen spalten Endostatin, das an Kollagen XVIII in vaskulären Basalmembranen und der Bruchschenden Membran gebunden ist. Durch die Spaltung wird Endostatin freigesetzt und aktiviert. Deshalb sei es nicht verwunderlich, dass die Expression von Endostatin in den entzündlich-aktiven CNV, die mit Bevacizumab behandelt worden waren, erhöht sei.

Ein weiterer Angiogenese-Inhibitor, der in der vorliegenden Arbeit in erhöhtem Maße bei AMD-Patienten in der Vorderkammer gemessen wurde, ist Thrombospondin-2 (THBS-2). THBS-2 induziert u.a. die Apoptose von Endothelzellen und inhibiert deren Migration *in vitro*, sodass es zur Inhibierung von Angiogenese kommt (Armstrong u. a., 2002; Noh u. a., 2003). Ferner spielt THBS-2 eine wichtige Rolle in akuten und chronischen Entzündungsprozessen; bei Entzündungen wird es induziert. Bei rheumatoider Arthritis bewirkt eine Überexpression von THBS-2 eine Inhibierung von läsionsbedingten

Vaskularisierungen, Suppression von proinflammatorischen Mediatoren und Entfernung von gewebsansässigen T-Zellen (Park u. a., 2004). Desweiteren führt ein Mangel an THBS-2 zu erhöhten Leveln von MMP-2 und MMP-9. Es wird angenommen, dass Matrixmetalloproteinasen die Angiogenese durch die Proteolyse von Endothel-Basalmembranen, welche dann die Sprossung und Invasion von Endothelzellen ermöglicht, begünstigen. MMP-9 soll die Freisetzung von matrixgebundenem VEGF bewirken, sodass es zu erhöhten Werten löslichen VEGFs kommt (Abu el -Asrar u. a., 2013). In Anlehnung an die Schlussfolgerungen von Abu El-Asrar zur Überexpression von THBS-2-Werten bei proliferativer diabetischer Retinopathie, kann die Hypothese aufgestellt werden, dass hier die erhöhten THBS-2-Werte bei Vorliegen von Rezidiven als Mechanismus des Auges betrachtet werden können, sich vor exzessiver Blutgefäßbildung und auch vor exzessiver Gewebsentzündung zu schützen (Abu el -Asrar u. a., 2013).

Da die Zusammenstellung und Kombinationsmöglichkeit der verschiedenen Messanalyte für die Luminex[®]-Kits nicht grenzenlos möglich ist, konnten in dieser Arbeit nicht alle Zytokine, die von Interesse sind, berücksichtigt werden. Der Angiogenese-Inhibitor *pigment epithelium derived factor* (PEDF) beispielsweise scheint ein interessanter Gegenspieler von VEGF zu sein (Holekamp u. a., 2002). PEDF inhibiert u.a. die Endothelzellmigration und -proliferation, und es wird vermutet, dass bei AMD-Patienten VEGF-Werte nicht erhöht, sondern dass die PEDF-Spiegel zu niedrig sind und dass vielmehr das VEGF-PEDF-Verhältnis für die Entwicklung einer exsudativen AMD von Bedeutung ist (Holekamp u. a., 2002; Pons, Marin-Castaño, 2011; Zamiri u. a., 2007). PEDF ist aber für Messungen mit der Luminex[®]-Technologie nicht verfügbar. Außerdem kann die durch die Firmen getroffene Vorauswahl der zur Verfügung stehenden Messanalyte als Bias, als systematischer Fehler, betrachtet werden.

Unter der Therapie mit Ranibizumab, einem Anti-VEGF-Medikament, konnten keine statistisch signifikanten Veränderungen der anderen Zytokine festgestellt werden. Sie wurden nicht signifikant supprimiert. Ähnliche Beobachtungen konnten Miao u.a. machen: Durch intravitreal verabreichtes Bevacizumab veränderten sich die intraokulären Level entzündungsassoziierter Zytokine (IL-6,-8) nicht (Miao u. a., 2012).

Aus den Messungen und Beobachtungen all dieser Zytokine lässt sich schließen, dass in der Pathogenese der AMD entzündungsassoziierte Prozesse eine wichtige Rolle spielen.

5.1.4 Andere Zytokine im Plasma

Die AMD-Patienten weisen im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöhte Spiegel von CRP und IL-8 im Plasma auf. Schaumberg u.a. stellten 2007 bereits fest, dass erhöhte Plasmaspiegel von CRP bei Frauen einer Entwicklung einer visusbeeinträchtigenden AMD vorangehen (Schaumberg u. a., 2007). Auch andere Autoren sehen einen Zusammenhang zwischen CRP-Leveln im Blut und AMD (Boekhoorn u. a., 2007; Hogg u. a., 2008; Hong u. a., 2011; Kikuchi u. a., 2007; Seddon u. a., 2004, 2005), andere hingegen konnten keinen Zusammenhang herstellen (Boey u. a., 2010; Ronald Klein u. a., 2005; Wu u. a., 2007). In einer vergleichenden Betrachtung von mehreren Studien kommen Hong u.a. zu dem abschließenden Urteil, dass hohe Serum-Level von CRP mit einer zweifachen Wahrscheinlichkeit, an der späten Form der AMD zu erkranken, verbunden sind (Hong u. a., 2011). Colak u.a. meinen, dass CRP nicht nur ein Entzündungsmarker, sondern ebenso ein Mediator in der Entwicklung von vaskulären Störungen in der retinalen Zirkulation ist (Colak u. a., 2011). In immortalisierter humaner RPE-Zelllinie führt eine Behandlung mit CRP zur Sekretion von IL-8 und zur Expression von VEGF (Wang u. a., 2010). CRP erhöht die IL-8-Sekretion in humanen Aorten-Endothelzellen (Devaraj u. a., 2004) und in humanen peripheren Blutmonozyten (Lim u. a., 2004; Xie u. a., 2005). IL-8 scheint im Rahmen der Angiogenese und als Ausdruck der AMD als entzündliches Krankheitsgeschehen systemisch erhöht zu sein. Außerdem wurde CRP in Drusen nachgewiesen (Anderson u. a., 2002).

Somit können die in dieser Arbeit gefundenen systemisch erhöhten CRP- und IL-8-Level als Aspekte einer entzündungsbedingten Pathogenese betrachtet werden. CRP gilt nicht nur als Marker für Entzündungen, sondern es ist als Teil des angeborenen Immunsystems auch in der Lage, das Komplementsystem zu aktivieren. Juel u.a. stellten die Hypothese auf, dass Entzündungsstimuli aus dem Blut bzw. ein chronischer systemischer Anstieg von proinflammatorischen Mediatoren wie dem CRP zur vermehrten Expression von Komplementfaktoren im RPE im Bereich der Makula führen. Diese Komplementexpression kann die Drusenbiogenese fördern - entweder direkt durch Proteinaggregation oder durch verminderte Opsonierung von sich entwickelnden Drusen. So kann erklärt werden, weshalb erhöhte Plasma-CRP-Werte mit erhöhter AMD-Prävalenz korrelieren (Juel u. a., 2011).

In Spenderaugen von AMD-Patienten wurden höhere Level von Komplementproteinen in der Bruchschen Membran und im Aderhautkomplex gefunden und auch im Plasma waren erhöhte Level von Komplementaktivierungsprodukten zu messen. Dies sei ein Hinweis darauf, dass AMD eine systemische Erkrankung sei (Charbel Issa u. a., 2011). Durch die auf der retinalen Seite der Bruchschen Membran befindlichen Drusen bzw. Ablagerungen, die altersbedingt

entstehen und unzureichend abgebaut werden, besteht ein ständiger Entzündungsreiz und das Komplementsystem wird aktiviert. Liegt zudem noch ein Polymorphismus bezüglich des Komplementfaktors H (CFH) vor, wie es häufig bei AMD-Patienten der Fall ist, fehlt eine wichtige inhibierend auf das Komplementsystem wirkende Kontrolle. So können wiederholte Komplementattacken auf RPE-Zellen stattfinden und Gewebe wird zerstört (Bhutto u. a., 2011; Hong u. a., 2011). Vor allem die Makula weist nach Ansicht von Issa u.a. minimale Resistenz gegen diese Komplementaktivierung auf und sei so äußerst verwundbar (Charbel Issa u. a., 2011). Außerdem ist in der Choroidea im Bereich der Makula eine zehnfach höhere Perfusion nachweisbar als in der peripheren Choroidea (Alm, Bill, 1973), sodass das RPE im Bereich der Makula in größerem Maße zirkulierenden Zytokinen und deren Wirkung ausgesetzt sei (Juel u. a., 2011). CRP hat zudem selbst auch eine antiinflammatorische Wirkung, indem es apoptotische Zellen vor der Lyse bewahrt. Dies wird dadurch erreicht, dass CRP an CFH bindet und auf diesem Weg die Bildung des Membranangriffskomplexes (MAC) innerhalb der Komplementkaskade verhindert. Beim CFH-Polymorphismus, der bei AMD-Patienten gehäuft auftritt, ist jedoch die Bindungsaffinität von CRP zu CFH herabgesetzt und diese antiinflammatorische Wirkung von CRP geht verloren (Black u. a., 2004; Gershov u. a., 2000).

Die Plasma-Level von MCP-1 bei den AMD-Patienten sind niedriger als die der Kontrollgruppe. Interessanterweise wurden bei Mäusen, die kein MCP-1 bzw. dessen Rezeptor exprimieren, Merkmale von AMD festgestellt (Bildung von Drusen neben dem RPE, Akkumulation von Lipofuszin in Drusen, Photorezeptoratrophie und CNV) (Ambati u. a., 2003b). Hier wird die Theorie aufgestellt, dass die durch den MCP-1-Mangel bedingte verminderte Rekrutierung von Makrophagen zu einer Anhäufung von C5a und IgG führt, wodurch wiederum die Produktion von VEGF im RPE induziert wird und die Entstehung einer CNV ermöglicht wird. In einer anschließenden Veröffentlichung erklärt die Arbeitsgruppe, dass es zu verringerter Makrophagenanzahl und zu Drusenbildung kommt (Anand u. a., 2012). Auch andere Autoren vertreten die Meinung, dass durch einen Mangel an MCP-1 zu wenig Makrophagen rekrutiert werden, um proinflammatorisch wirkenden Debris ausreichend zu phagozytieren, sodass es zur Akkumulation von Drusen, zur Infiltration proangiogenetischer Makrophagen und schließlich zur Progression einer CNV kommt (Pons, Marin-Castaño, 2011). Leider fehlen weitere Veröffentlichungen zu MCP-1-Leveln im Blut von AMD-Patienten. Eine abschließende Interpretation der hier gemachten Beobachtungen ist daher nicht möglich, weitere vergleichende Messungen wären von Interesse. Aufgrund der unterschiedlichen Werte von MCP-1 im Plasma von AMD-Patienten und gesunden Probanden

kann aber gesagt werden, dass sich der Krankheitsprozess der AMD mit großer Wahrscheinlichkeit nicht nur auf lokaler Ebene im Auge, sondern auch auf systemischer Ebene abspielt.

Diese Ergebnisse der Plasmamessungen legen nahe, dass die AMD auch als chronische systemische inflammatorische Erkrankung betrachtet werden muss. Allerdings konnten in der vorliegenden Arbeit keine Korrelationen zwischen den Zytokinen auf okulärer und bzw. oder auf systemischer Ebene gefunden werden. Möglicherweise finden die unterschiedlichen Zytokinveränderungen unabhängig voneinander statt, beziehungsweise der Zusammenhang ist derart komplex, dass weitergehende Analysen der Messwerte von Nöten sind.

5.2 Diabetisches Makulaödem

5.2.1 VEGF und andere Zytokine in der Vorderkammer

Bislang wurde die intravitreale Anti-VEGF-Behandlung mit Ranibizumab v.a. nur bei Patienten, die an AMD leiden, angewendet. Erst seit dem Jahr 2011 ist Lucentis® für die Behandlung des diabetischen Makulaödems in Deutschland zugelassen. In den USA genehmigte die Lebens- und Arzneimittelbehörde (Food and Drug Administration) die Anwendung von Lucentis® beim diabetischen Makulaödem sogar erst im August 2012. Bei den Patienten mit diabetischem Makulaödem wurde in dieser Arbeit ein erhöhter VEGF-Wert in der Vorderkammer vor Therapiebeginn im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt. Viele Autoren haben den gleichen Sachverhalt feststellen können (Boehm u. a., 2003; Endo u. a., 2001; Funatsu u. a., 2002; Funk u. a., 2010; Lim, Han, 2011; Oh u. a., 2010), einige haben die Zytokine im Glaskörper statt in der Vorderkammer des Auges gemessen

(Endo u. a., 2000; Funatsu u. a., 2009; Maier u. a., 2008). Allerdings scheint auch hier, wie zuvor bei den AMD-Patienten, eine Korrelation zwischen den im Glaskörper und den in der Vorderkammer gemessenen Werten zu bestehen. Die Werte im Glaskörper sind absolut betrachtet höher als diejenigen aus dem vorderen Augenabschnitt. Funatsu u.a. erklären, dass eine Diffusion aufgrund unterschiedlicher Konzentrationsgradienten von der hinteren zur vorderen Augenkammer stattfindet. Dieser Gradient wäre möglicherweise durch die schnellere Entfernung der Zytokine aus der Vorderkammer oder aber durch einen schnelleren Abbau dieser in der Vorderkammer bedingt (Funatsu u. a., 2005). Quam und Kollegen fanden heraus, dass die Blut-Retina-Schranke durch hohe VEGF-Level zusammenbricht. Das retinale Pigmentepithel (äußere Schranke) und das retinale Gefäßendothel (innere Schranke) bilden

zusammen, jeweils mit ihren *tight junctions*, die Blut-Retina-Schranke. Wird diese Schranke durchbrochen, kann es zu einem Netzhautödem kommen. Quam erklärt, dass endogenes VEGF eine Expression von ICAM-1 in der Retina von Diabetikern bewirke. ICAM-1 wiederum führe über eine Adhäsion von Leukozyten in den retinalen Blutgefäßen zur Störung der Blut-Retina-Schranke. Durch die Fähigkeit der Leukozyten, Zell-Zell-Verbindungen des Endothels und *tight junctions* umzuordnen, könne ein Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke bedingt sein. Zusätzlich führe das in den Leukozyten selbst enthaltene VEGF zu einer weiteren Verstärkung des permeabilitätssteigernden Effekts (Qaum u. a., 2001). Die in dieser Arbeit gemessenen erhöhten VEGF-Werte in der Vorderkammerflüssigkeit der Diabetiker können somit als ursächlich für das diabetische Makulaödem angesehen werden.

Ähnlich wie bei den AMD-Patienten führen die intravitrealen Spritzen mit Ranibizumab zu einem Absinken der VEGF-Level in der Vorderkammer. Erfolgt über einen bestimmten Zeitraum keine Gabe von Lucentis® ins Auge, so steigen die VEGF-Werte wieder an. Anhand der Daten der einzelnen Patienten konnte auch hier eine durchschnittliche Suppressionszeit von VEGF in der Vorderkammer ermittelt werden. Sie liegt bei 28 Tagen und unterscheidet sich interessanterweise demnach nicht von der Suppressionsdauer, die bei den AMD-Patienten festgestellt werden konnte. Die Annahme, dass Patienten mit diabetischem Makulaödem eine höhere Dosis an Ranibizumab bräuchten als Patienten, die an AMD erkrankt sind, kann durch die vorliegenden Daten zurückgewiesen werden. Die VEGF-Level werden durch 0,5 mg intravitreal verabreichtes Lucentis® bis zur Nachweisgrenze bzw. unter physiologische Level und auch für die gleich lange Dauer wie bei den AMD-Patienten supprimiert. Dass VEGF-Spiegel in der Vorderkammer von Diabetikern durch ein bzw. zwei intravitreale Spritzen mit Ranibizumab gesenkt werden können, zeigten Campochiaro u.a. (Campochiaro u. a., 2009). Soweit bekannt ist, wurden nun hier in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal Vorderkammerproben von Patienten mit diabetischem Makulaödem über einen längeren Zeitraum im Verlauf der Therapie mit Ranibizumab gemessen und analysiert. Erstmalig wurden Suppressionszeiten von VEGF in der Vorderkammer bei Patienten mit diabetischem Makulaödem unter Ranibizumabtherapie bestimmt.

Desweiteren zeigen die vorliegenden Daten im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöhte Werte von MCP-1, IL-8 und VCAM-1 in der Vorderkammerflüssigkeit der diabetischen Patienten. Dies konnten auch andere Wissenschaftler und Kollegen beobachten (Funk u. a., 2010; Oh u. a., 2010; Sohn u. a., o. J.; Tashimo u. a., 2004). Die Zytokine werden vermutlich direkt von den Zellen im Auge (RPE, Gliazellen, Monozyten, Makrophagen) bzw. der Retina exprimiert

(Hernández u. a., 2005). Im Glaskörper wurden u.a. MCP-1 (Funatsu u. a., 2009; Maier u. a., 2008) und IL-8 (Funatsu u. a., 2009, 2009; Hernández u. a., 2005) auch im erhöhten Maße gefunden. MCP-1 wirkt vermutlich in ähnlicher Weise wie bei AMD, sodass Makrophagen aktiviert werden und zu einer Schädigung des RPE und der Bruchschens Membran führen. Zudem erhöht Hyperglykämie die MCP-1-Generierung aus RPE-Zellen und retinalen vaskulären Endothelzellen (Bian u. a., 2001). Bei Mäusen mit einem Knock-out des CCL-2/MCP-1-Gens konnten Schädigungen der Blut-Retina-Schranke verhindert werden (Rangasamy u. a., 2012). Das Chemokin IL-8 führt möglicherweise durch seine proangiogenetische Wirkung u.a. zur Proliferation und Bildung von Kapillarstrukturen. IL-8 wird von vaskulären retinalen Endothelzellen bei diabetischer Neovaskularisation exprimiert (Yoshida u. a., 1998). VCAM-1 vermittelt einen proinflammatorischen Effekt durch Rekrutierung inflammatorischer Leukozyten. Die dadurch bedingte Leukostase führt über Endothelzellschädigung zu Schäden der Blut-Retina-Schranke (Joussen u. a., 2001), die schließlich zu einer Ansammlung von Flüssigkeit in der Makula führen. Um die hier gefundenen Ergebnisse zu verifizieren und genauere Unterscheidungen der Zytokinspiegelverläufe zu den unterschiedlichen Therapiezeitpunkten treffen zu können, werden derzeit weitere Proben von DME-Patienten generiert und analysiert.

Eine Reduzierung der Zytokinlevel in der Vorderkammer wird durch die Anti-VEGF-Therapie nicht erreicht, dies steht im Einklang mit den Beobachtungen von Funk u.a. (Funk u. a., 2010).

5.2.2 VEGF und andere Zytokine im Plasma

Im Plasma waren die VEGF-Spiegel, entsprechend den Ergebnissen bei den Plasmaproben der AMD-Patienten, im Vergleich zur Kontrollgruppe in den Analysen dieser Arbeit nicht erhöht. Ebenso waren auch andere Zytokine bei den Diabetikern im Plasma nicht erhöht, auch wenn andere Wissenschaftler eben eine solche Erhöhung von VEGF oder von Entzündungsparametern im Blut von Patienten mit diabetischer Retinopathie feststellen konnten (Abu el -Asrar u. a., 1997; Kaul u. a., 2010; Koleva-Georgieva u. a., 2011). Allerdings haben einige Wissenschaftler auch Erhöhungen der Zytokinlevel nur im Glaskörper bzw. der Vorderkammerflüssigkeit und keine entsprechenden Erhöhungen in Blutproben feststellen können (Abu el -Asrar u. a., 1992; Shinoda u. a., 1999). Die niedrige Anzahl von Blutproben erschwert es, hier gesicherte Aussagen machen zu können. Auch die Entwicklung der Plasmaspiegel von VEGF und der anderen Zytokine unter der Therapie mit

Ranibizumab konnte in dieser Arbeit nicht näher analysiert werden. Es muss weiter untersucht werden, ob die Bildung eines diabetischen Makulaödems bezüglich der Zytokinspiegel nicht nur als lokaler, sondern auch als systemischer Prozess betrachtet werden muss.

Es lässt sich schlussfolgern, dass in der Entwicklung der diabetischen Retinopathie und des diabetischen Makulaödems angiogene und inflammatorische Elemente eine Rolle spielen.

Um auch den genauen Einfluss der verschiedenen Zytokine auf funktioneller Ebene zu analysieren, wären Untersuchungen und Verfahren im Rahmen der Proteomik von Interesse.

5.3 Ausblick in die Veterinärmedizin

Als kleiner Ausblick in die Veterinärmedizin darf erwähnt werden, dass auch bei Tieren Proben von Vorderkammerflüssigkeiten analysiert werden.

Sandberg und KollegInnen (Sandberg u. a., 2012) haben bei Hunden VEGF sowohl im Plasma als auch in Vorderkammerproben gemessen. Es stellte sich heraus, dass VEGF in der Vorderkammer bei Patienten mit intraokulären Krankheiten (primäres Glaukom, uveitisches Glaukom, aphakes/pseudophakes Glaukom, Netzhautablösung, Linsenluxation, intraokulare Neoplasie) im Vergleich zu einer Kontrollgruppe erhöht war, bei Vorliegen einer primären oder diabetischen Katarakt waren die Werte nicht erhöht. Ebenso konnte keine Korrelation zwischen VEGF-Blut- und Vorderkammerwerten festgestellt werden. Zusätzlich war bei Vorhandensein einer präiridialen fibrovaskulären Membran VEGF in der Vorderkammer erhöht.

Der mit Galaktose gefütterte Hund ist ein Tiermodell, das fortgeschrittene Stadien der proliferativen Retinopathie entwickelt (Murata u. a., 2000). VEGF stimuliert hier Zellwachstum und Gefäßbildung der retinalen kapillären Endothelzellen des Hundes.

Abrams und KollegInnen untersuchten diabetische Hunde. Im Vergleich zu gesunden Hunde wiesen die diabetischen Hunde im Plasma erhöhte VEGF-Werte auf. Allerdings konnten die Wissenschaftler in der Vorderkammerflüssigkeit keine erhöhten VEGF-Werte feststellen. Sie stellen die Hypothese auf, dass dies der Grund sein könnte, weshalb Hunde vor der Entwicklung einer diabetischen Retinopathie geschützt seien (Abrams u. a., 2011). Dahingegen existieren einzelne Falldarstellungen von Hunden, die eine diabetische Retinopathie entwickelt haben (Barnett, 1981; Monti u. a., 1976). Binder u.a. stellten 2012 (Binder u. a., 2012) dar, dass VEGF-Rezeptoren sowohl bei physiologischer als auch pathologischer Angiogenese im Auge des Hundes eine Rolle spielen. Sie postulierten, dass die

Manipulation dieses Signalweges eine vernünftige Überlegung für die therapeutische Intervention bei okulären Krankheiten des Hundes, die eine pathologische Neovaskularisation aufwiesen, wäre. Am Zentrum für Augenheilkunde des Universitätsklinikums Köln werden auch Tiere, vor allem Mäuse und Kaninchen, hinsichtlich ihres Ansprechens auf eine Anti-VEGF-Therapie untersucht und in die Forschung mit eingebunden.

Somit könnten in Zukunft vielleicht auch Tiere von einer intravitrealen Anti-VEGF-Therapie profitieren.

6. Schlussfolgerung

Abschließend lässt sich sagen, dass sowohl in der Behandlung der AMD als auch des diabetischen Makulaödems der Einsatz von Ranibizumab zu einer erfolgreichen Reduzierung der VEGF-Spiegel in der Vorderkammer führt. Diese Suppression kann bei beiden Krankheitsgeschehen für die Dauer von 28 Tagen sicher erreicht werden. Wenn eine dauerhafte Suppression der VEGF-Werte angestrebt wird, so sollten die intravitrealen Spritzen mit Ranibizumab im vierwöchigen Abstand erfolgen. Dies gilt auch für die Langzeitbehandlung mit Ranibizumab, da in der vorliegenden Arbeit bei den AMD-Patienten keine Anzeichen für Gewöhnung oder Toleranzentwicklung gegenüber dem Medikament festgestellt werden konnten. Da sich unter der Therapie die VEGF-Spiegel der hier untersuchten Patienten im Plasma senken, sollte bei einer Anti-VEGF-Therapie die systemische Situation mitberücksichtigt werden, sodass physiologische, VEGF-abhängige Prozesse nicht behindert oder unterbunden werden. Trotz supprimierter VEGF-Spiegel zeigt sich bei einigen AMD-Patienten ein persistierendes Makulaödem, sodass noch andere Faktoren eine Rolle im Krankheitsgeschehen zu spielen scheinen. Möglicherweise sind die in dieser Arbeit sowohl lokal als auch systemisch gemessenen erhöhten Spiegel von Zytokinen, die ein Entzündungsgeschehen bedingen und aufrecht erhalten, bedeutsam. Diese Beobachtungen unterstützen die Hypothese, dass in der Pathogenese der AMD, neben genetischen und umweltassoziierten Faktoren, Entzündungsprozesse beteiligt sind. Da sich die Spiegel dieser Zytokine durch die Ranibizumab-Therapie nicht veränderten, muss darüber nachgedacht werden, die Inhibition dieser in neuen Therapieansätzen zu berücksichtigen. Dies ist gerade auch für Patienten wichtig, die bislang von einer Anti-VEGF-Therapie allein nicht profitieren konnten. Die AMD stellt sich somit als chronische systemische und entzündliche Erkrankung dar, deren Pathogenese multifaktoriell ist. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch beim diabetischen Makulaödem der Einsatz von intravitreal verabreichtem Ranibizumab, das erst seit 2011 für diese Indikation in Deutschland zugelassen ist, zu einer stabilen Suppression von VEGF in der Vorderkammer führt. Die Analyse der Messungen der Vorderkammerproben lässt schlussfolgern, dass neben VEGF auch hier weitere Zytokine im Krankheitsgeschehen involviert sind. Entzündung scheint in beiden Erkrankungen von Bedeutung zu sein, sodass neben der Inhibition der Angiogenese durch Anti-VEGF-Medikamente auch die Regulierung weiterer angiogener und entzündungsassoziiierter Zytokine in die Therapie mit einbezogen werden sollte.

7. Zusammenfassung

In der Behandlung retinaler Erkrankungen, die mit Neovaskularisationen einhergehen, haben intravitreal applizierte Anti-VEGF-Medikamente eine große Bedeutung gewonnen. Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor VEGF-A ist einer der hauptsächlichen Regulatoren der Angiogenese und führt zu einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität. Als VEGF-Inhibitor im okulären Bereich ist Ranibizumab, ein rekombinantes humanisiertes monoklonales Antikörperfragment, das eine hohe Affinität für alle VEGF-A-Isoformen aufweist, zugelassen. Es wird hauptsächlich bei der altersabhängigen Makuladegeneration (AMD) und dem diabetischen Makulaödem (DME) intravitreal verabreicht.

Die AMD ist die häufigste Erblindungsursache für Menschen über 65 Jahren in den Industrienationen. Die Erkrankung tritt in der sogenannten „trockenen“ Form und in der exsudativen Form auf, die durch die Bildung neuer Gefäße (choroidale Neovaskularisationen) und der sich anschließenden Bildung von Ödemen im Bereich der Makula charakterisiert ist. Neben genetischer Prädisposition und Nikotingenuss sind die Ursachen und die genaue Pathogenese der Erkrankung noch nicht abschließend geklärt.

Das DME tritt im Rahmen der diabetischen Retinopathie auf. Die diabetische Retinopathie gilt als häufigste Erblindungsursache in jungen Jahren in den Industrienationen und stellt eine Folge von Diabetes-mellitus-Erkrankungen dar. Makulaödeme können unbehandelt zur Erblindung führen.

Auch wenn sich das Interesse in der Behandlung der exsudativen AMD und des DME fast ausschließlich auf VEGF konzentriert, könnten doch andere Wachstumsfaktoren und Zytokine die Erkrankungen mit beeinflussen. In der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, welche Zytokine vor Therapiebeginn im Kammerwasser nachgewiesen werden können, wie sich die Zytokine im Therapieverlauf verändern, und es wurde der Frage nachgegangen, ob der Therapieerfolg vom Zytokin-Milieu abhängt.

Dazu wurden VEGF-Spiegel und weitere Zytokine, die inflammatorisch, angiogen oder zelladhäsiv wirken (Endostatin, *fibroblast growth factor-acidic* (FGF-a), *placental growth factor* (PlGF), *platelet derived growth factor* (PDGF)-AA, Thrombospondin (THBS)-2, Angiogenin, Interleukin-1- β , Interleukin-4, Interleukin-6, Interleukin-8, Interleukin-10, Interleukin-17, Tumornekrosefaktor (TNF)- α , Interferon (IFN)- γ , *monocyte chemoattractant protein* (MCP)-1, *vascular cell adhesion molecule* (VCAM)-1, *intercellular adhesion molecule* (ICAM)-1, C-reaktives Protein (CRP)), in Vorderkammerproben von 54 AMD-Patienten und 16 Patienten mit DME vor und während der Therapie mit Ranibizumab

gemessen. Zusätzlich wurden Plasmaproben untersucht, um die systemische Ebene zu betrachten, und es wurden alle Parameter mit denen einer gesunden Kontrollgruppe, die sich einer Katarakt-Operation unterzog, verglichen. Erstmals wurden hier diese Daten im Rahmen einer Langzeittherapie über einen Zeitraum von drei Jahren erhoben. Dank der Luminex®-Technologie konnten alle oben genannten Faktoren in den limitierten Patientenproben simultan und quantitativ in den zum Teil sehr kleinen Probenvolumina bestimmt werden.

Bei den AMD-Patienten ergaben die Messungen, dass durch die Therapie mit Ranibizumab eine sichere Suppression von VEGF in der Vorderkammerflüssigkeit für die Dauer von 28 Tagen erreicht wird. In der Langzeitanwendung von Ranibizumab konnten keine Anzeichen für Gewöhnung oder Toleranz beobachtet werden. Während der Suppression traten keine Rezidive auf. Trotz VEGF-Suppression wurden allerdings persistierende Ödeme diagnostiziert. Zudem waren die VEGF-Werte in der Vorderkammer im Vergleich zur Kontrolle nicht erhöht, sodass allein anhand der VEGF-Werte eine aktive AMD und choroidale Neovaskularisationen (CNV) nicht erkannt werden können. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass zusätzliche Faktoren neben VEGF an der Pathogenese beteiligt sein müssen. Entsprechend konnten signifikant erhöhte Level von IL-6, IL-8, MCP-1, ICAM-1 und VCAM-1 in den Vorderkammerproben und von IL-8 und CRP in den Plasmaproben nachgewiesen werden.

Bei den Patienten mit DME konnte ebenfalls eine sichere Suppression von VEGF in der Vorderkammerflüssigkeit durch die Ranibizumab-Therapie für die Dauer von 28 Tagen festgestellt werden. Während bei den Plasmaproben im Vergleich zur Kontrolle keine Unterschiede festgestellt werden konnten, wurden in den Vorderkammerproben neben einer Erhöhung von VEGF erhöhte Spiegel von IL-8, MCP-1 und VCAM-1 gemessen. Es scheinen somit auch in der Pathogenese des DME weitere Zytokine neben VEGF eine Rolle zu spielen. Die Spiegel dieser Zytokine wurden durch die Anti-VEGF-Therapie bei beiden Patientengruppen nicht verändert. Daher sollten in der Behandlung der Erkrankungen auch Inhibitoren anderer Zytokine Berücksichtigung erfahren, um auch Patienten, die beispielsweise unter persistierenden Ödemen leiden und von einer alleinigen Anti-VEGF-Behandlung bislang nicht profitieren konnten, helfen zu können. Die AMD und das DME müssen als chronische, systemische und entzündliche Erkrankungen angesehen werden, deren Pathogenese multifaktoriell ist.

8. Summary

Intravitreal injections of anti-VEGF drugs play an important role in the treatment of retinal diseases which are associated with neovascularization. Vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) is a key regulator of angiogenesis and increases vascular permeability. The recombinant human monoclonal antibody fragment Ranibizumab, which has a high affinity for all VEGF-A-isoforms, is approved as an ocular VEGF-inhibitor. Ranibizumab is especially used for intravitreal injections in age-related macular degeneration (AMD) and diabetic macular edema (DME).

AMD is the leading cause of blindness in the developed countries in people over 65 years of age. This disease occurs in a dry form and in an exudative form characterized by newly formed vessels (choroidal neovascularizations) and edemas in the macula.

DME often develops in the course of diabetic retinopathy. Diabetic retinopathy is the major cause of blindness in industrial nations in young people and is a consequence of diabetes mellitus. Macular edema can lead to blindness when untreated.

Although the interest in the therapy of AMD and DME is mainly focused on VEGF other growth factors and cytokines could also affect these diseases. Thus the current study analyzes which cytokines could be detected before treatment, how they change during treatment and if therapeutic success is dependent on cytokine environment.

Therefore VEGF levels and inflammatory, angiogenic and adhesion cytokines (i.e. endostatin, fibroblast growth factor acidic (FGF-a), placental growth factor (PIGF), platelet derived growth factor (PDGF)-AA, thrombospondin (THBS)-2, angiogenin, interleukin-1 β , interleukin-4, interleukin-6, interleukin-8, interleukin-10, interleukin-17, tumour necrosis faktor (TNF)- α , interferon (IFN)- γ , monocyte chemoattractant protein (MCP)-1, vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1, intercellular adhesion molecule (ICAM)-1, C-reactive protein (CRP)) were measured in the aqueous humor of 54 AMD patients and 16 DME patients before and during therapy with ranibizumab as well as in plasma samples in order to determine systemic levels. All parameters were compared to a healthy control group undergoing cataract surgery. This analysis shows for the first time data generated over a long time period of three years. Using the luminex technology for analysis allowed quantitative and simultaneous measurement of all cytokines even for low volumes of samples.

Data obtained from AMD-patients showed that intravitreal ranibizumab injections lead to VEGF suppression that lasts for 28 days. There were no signs of addiction or tolerance to ranibizumab even after long-term treatment. Recurrences were not detected during VEGF

suppression. However, despite complete VEGF suppression several patients were diagnosed with persistent edema. In addition, VEGF levels were not increased in aqueous humor samples of AMD patients leading to the conclusion that VEGF levels alone cannot be used to identify active AMD or choroidal neovascularizations (CNV). These observations lead to the assumption that factors other than VEGF may play a role in the pathogenesis. According to this hypothesis significantly elevated levels of IL-6, IL-8, MCP-1, ICAM-1 and VCAM-1 could be detected in aqueous humor samples and levels of IL-8 and CRP were increased in plasma samples.

Patients suffering from DME showed the same duration of VEGF suppression of 28 days following ranibizumab treatment. While plasma samples showed no differences, aqueous humors samples revealed increased levels of VEGF and IL-8, MCP-1 and VCAM-1. Thus, also other cytokines apart from VEGF seem to play a role in the pathogenesis of DME. However, the levels of these other cytokines were not affected by anti-VEGF-therapy in both patient groups.

Concluding from these observations inhibitors of other cytokines than VEGF should be taken into consideration in order to help patients who could not benefit from anti-VEGF-therapy yet. AMD and DME must be seen as chronic systemic and inflammatory diseases with multifactorial pathogenesis.

Literaturverzeichnis

- Abdelsalam, A; Del Priore, L; Zarbin, M A (1999): „Drusen in age-related macular degeneration: pathogenesis, natural course, and laser photocoagulation-induced regression“. In: *Survey of ophthalmology*. 44 (1), S. 1–29.
- Abrams, Kenneth L; Stabila, Paul F; Kauper, Konrad; Elliott, Susan (2011): „Vascular endothelial growth factor in diabetic and nondiabetic canine cataract patients“. In: *Veterinary ophthalmology*. 14 (2), S. 93–99.
- Abu el -Asrar, A M; Van Damme, J; Put, W; Veckeneer, M; Dralands, L; Billiau, A; Missotten, L (1997): „Monocyte chemotactic protein-1 in proliferative vitreoretinal disorders“. In: *American journal of ophthalmology*. 123 (5), S. 599–606.
- Abu el -Asrar, A M; Maimone, D; Morse, P H; Gregory, S; Reder, A T (1992): „Cytokines in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy“. In: *American Journal of Ophthalmology*. 114 (6), S. 731–736.
- Abu el -Asrar, Ahmed M; Nawaz, Mohd I; Ola, Mohammad S; De Hertogh, Gert; Opdenakker, Ghislain; Geboes, Karel (2013): „Expression of thrombospondin-2 as a marker in proliferative diabetic retinopathy“. In: *Acta ophthalmologica*. 91 (3), S. e169–177, DOI: 10.1111/aos.12035.
- Alm, A; Bill, A (1973): „Ocular and optic nerve blood flow at normal and increased intraocular pressures in monkeys (*Macaca irus*): a study with radioactively labelled microspheres including flow determinations in brain and some other tissues“. In: *Experimental eye research*. 15 (1), S. 15–29.
- Ambati, Jayakrishna; Ambati, Balamurali K; Yoo, Sonia H; Ianchulev, Sean; Adamis, Anthony P (2003a): „Age-related macular degeneration: etiology, pathogenesis, and therapeutic strategies“. In: *Survey of Ophthalmology*. 48 (3), S. 257–293.
- Ambati, Jayakrishna; Anand, Akshay; Fernandez, Stefan; Sakurai, Eiji; Lynn, Bert C; Kuziel, William A; Rollins, Barrett J; Ambati, Balamurali K (2003b): „An animal model of age-related macular degeneration in senescent Ccl-2- or Ccr-2-deficient mice“. In: *Nature medicine*. 9 (11), S. 1390–1397.
- Anand, Akshay; Sharma, Neel Kamal; Gupta, Amod; Prabhakar, Sudesh; Sharma, Suresh Kumar; Singh, Ramandeep; Gupta, Pawan Kumar (2012): „Single nucleotide polymorphisms in MCP-1 and its receptor are associated with the risk of age related macular degeneration“. In: *PloS one*. 7 (11), S. e49905, DOI: 10.1371/journal.pone.0049905.
- Anderson, Don H; Mullins, Robert F; Hageman, Gregory S; Johnson, Lincoln V (2002): „A role for local inflammation in the formation of drusen in the aging eye“. In: *American Journal of Ophthalmology*. 134 (3), S. 411–431.
- Apte, Rajendra S; Modi, Marlene; Masonson, Harvey; Patel, Manju; Whitfield, Lloyd; Adamis, Anthony P (2007): „Pegaptanib 1-year systemic safety results from a safety-

- pharmacokinetic trial in patients with neovascular age-related macular degeneration“. In: *Ophthalmology*. 114 (9), S. 1702–1712.
- Armstrong, Lucas C; Björkblom, Benny; Hankenson, Kurt D; Siadak, Anthony W; Stiles, Charlotte E; Bornstein, Paul (2002): „Thrombospondin 2 inhibits microvascular endothelial cell proliferation by a caspase-independent mechanism“. In: *Molecular biology of the cell*. 13 (6), S. 1893–1905.
- Austin, Bobbie Ann; Liu, Baoying; Li, Zhuqing; Nussenblatt, Robert B. (2009): „Biologically Active Fibronectin Fragments Stimulate Release of MCP-1 and Catabolic Cytokines from Murine Retinal Pigment Epithelium“. In: *Investigative ophthalmology & visual science*. 50 (6), S. 2896–2902.
- Baggiolini, M; Clark-Lewis, I (1992): „Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine“. In: *FEBS letters*. 307 (1), S. 97–101.
- Bakri, Sophie J; Snyder, Melissa R; Reid, Joel M; Pulido, Jose S; Ezzat, Mohamed K; Singh, Ravinder J (2007): „Pharmacokinetics of intravitreal ranibizumab (Lucentis)“. In: *Ophthalmology*. 114 (12), S. 2179–2182.
- Banks, R E; Forbes, M A; Kinsey, S E; Stanley, A; Ingham, E; Walters, C; Selby, P J (1998): „Release of the angiogenic cytokine vascular endothelial growth factor (VEGF) from platelets: significance for VEGF measurements and cancer biology“. In: *British Journal of Cancer*. 77 (6), S. 956–964.
- Barnett, K C (1981): „Diabetic retinopathy in the dog“. In: *The British journal of ophthalmology*. 65 (5), S. 312–314.
- Benson, M T; Shepherd, L; Rees, R C; Rennie, I G (1992): „Production of interleukin-6 by human retinal pigment epithelium in vitro and its regulation by other cytokines“. In: *Current eye research*. 11 Suppl , S. 173–179.
- Bhutto, Imran A; Baba, Takayuki; Merges, Carol; Juriasinghani, Vikash; McLeod, D Scott; Luty, Gerard A (2011): „C-reactive protein and complement factor H in aged human eyes and eyes with age-related macular degeneration“. In: *The British Journal of Ophthalmology*. 95 (9), S. 1323–1330.
- Bhutto, Imran A.; Uno, Koichi; Merges, Carol; Zhang, Lei; McLeod, D. Scott; Luty, Gerard A. (2008): „Reduction of Endogenous Angiogenesis Inhibitors in Bruch’s Membrane of the Submacular Region in Eyes With Age-Related Macular Degeneration“. In: *Arch Ophthalmol*. 126 (5), S. 670–678.
- Bian, Z M; Elner, V M; Yoshida, A; Kunkel, S L; Elner, S G (2001): „Signaling pathways for glycated human serum albumin-induced IL-8 and MCP-1 secretion in human RPE cells“. In: *Investigative ophthalmology & visual science*. 42 (7), S. 1660–1668.
- Binder, Daniel R; Herring, Ian P; Zimmerman, Kurt L; Pickett, J Phillip; Huckle, William R (2012): „Expression of vascular endothelial growth factor receptor-1 and -2 in normal and diseased canine eyes“. In: *Veterinary ophthalmology*. 15 (4), S. 223–230.

- Bird, A C; Bressler, N M; Bressler, S B; Chisholm, I H; Coscas, G; Davis, M D; de Jong, P T; Klaver, C C; u. a. (1995): „An international classification and grading system for age-related maculopathy and age-related macular degeneration. The International ARM Epidemiological Study Group“. In: *Survey of ophthalmology*. 39 (5), S. 367–374.
- Black, Steven; Kushner, Irving; Samols, David (2004): „C-reactive Protein“. In: *Journal of Biological Chemistry*. 279 (47), S. 48487–48490.
- Boehm, B O; Lang, G; Feldmann, B; Kurkhaus, A; Rosinger, S; Volpert, O; Lang, G K; Bouck, N (2003): „Proliferative diabetic retinopathy is associated with a low level of the natural ocular anti-angiogenic agent pigment epithelium-derived factor (PEDF) in aqueous humor. a pilot study“. In: *Hormone and Metabolic Research = Hormon- Und Stoffwechselforschung = Hormones Et Métabolisme*. 35 (6), S. 382–386.
- Boekhoorn, Sharmila S; Vingerling, Johannes R; Witteman, Jacqueline C M; Hofman, Albert; de Jong, Paulus T V M (2007): „C-reactive protein level and risk of aging macula disorder: The Rotterdam Study“. In: *Archives of ophthalmology*. 125 (10), S. 1396–1401.
- Boey, Pui Yi; Tay, Wan Ting; Lamoureux, Ecosse; Tai, E. Shyong; Mitchell, Paul; Wang, Jie Jin; Saw, Seang Mei; Wong, Tien Yin (2010): „C-Reactive Protein and Age-Related Macular Degeneration and Cataract: The Singapore Malay Eye Study“. In: *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 51 (4), S. 1880 –1885.
- Boulton, M; Moriarty, P; Jarvis-Evans, J; Marcyniuk, B (1994): „Regional variation and age-related changes of lysosomal enzymes in the human retinal pigment epithelium“. In: *The British journal of ophthalmology*. 78 (2), S. 125–129.
- Brankin, B; Campbell, M; Canning, P; Gardiner, T A; Stitt, A W (2005): „Endostatin modulates VEGF-mediated barrier dysfunction in the retinal microvascular endothelium“. In: *Experimental eye research*. 81 (1), S. 22–31.
- Brat, Daniel J; Bellail, Anita C; Van Meir, Erwin G (2005): „The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis“. In: *Neuro-oncology*. 7 (2), S. 122–133.
- Busbee, Brandon G; Ho, Allen C; Brown, David M; Heier, Jeffrey S; Suñer, Ivan J; Li, Zhengrong; Rubio, Roman G; Lai, Phillip; u. a. (2013): „Twelve-month efficacy and safety of 0.5 mg or 2.0 mg ranibizumab in patients with subfoveal neovascular age-related macular degeneration“. In: *Ophthalmology*. 120 (5), S. 1046–1056.
- Cai, Jiyang; Nelson, Kasey C; Wu, Mei; Sternberg Jr, Paul; Jones, Dean P (2000): „Oxidative damage and protection of the RPE“. In: *Progress in Retinal and Eye Research*. 19 (2), S. 205–221.
- Campochiaro, P A; Glaser, B M (1985): „Platelet-derived growth factor is chemotactic for human retinal pigment epithelial cells“. In: *Archives of ophthalmology*. 103 (4), S. 576–579.

- Campochiaro, Peter A; Choy, David F; Do, Diana V; Hafiz, Gulnar; Shah, Syed Mahmood; Nguyen, Quan D; Rubio, Roman; Arron, Joseph R (2009): „Monitoring ocular drug therapy by analysis of aqueous samples“. In: *Ophthalmology*. 116 (11), S. 2158–2164.
- Carneiro, Angela M; Costa, Raquel; Falcão, Manuel S; Barthelmes, Daniel; Mendonça, Luis S; Fonseca, Sofia L; Gonçalves, Rita; Gonçalves, Conceição; u. a. (2012): „Vascular endothelial growth factor plasma levels before and after treatment of neovascular age-related macular degeneration with bevacizumab or ranibizumab“. In: *Acta ophthalmologica*. 90 (1), S. e25–30.
- Chakravarthy, U; Augood, C; Bentham, G C; de Jong, P T V M; Rahu, M; Seland, J; Soubrane, G; Tomazzoli, L; u. a. (2007): „Cigarette smoking and age-related macular degeneration in the EUREYE Study“. In: *Ophthalmology*. 114 (6), S. 1157–1163.
- Chakravarthy, Usha; Harding, Simon P; Rogers, Chris A; Downes, Susan M; Lotery, Andrew J; Wordsworth, Sarah; Reeves, Barnaby C. (2012): „Ranibizumab versus Bevacizumab to Treat Neovascular Age-related Macular Degeneration: One-Year Findings from the IVAN Randomized Trial“. In: *Ophthalmology*. 119 (7), S. 1399–1411.
- Charbel Issa, Peter; Chong, N Victor; Scholl, Hendrik P N (2011): „The significance of the complement system for the pathogenesis of age-related macular degeneration - current evidence and translation into clinical application“. In: *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv für klinische und experimentelle Ophthalmologie*. 249 (2), S. 163–174.
- Cohen, T; Nahari, D; Cerem, L W; Neufeld, G; Levi, B Z (1996): „Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor“. In: *The Journal of Biological Chemistry*. 271 (2), S. 736–741.
- Colak, Emina; Kosanović-Jaković, Natalija; Zorić, Lepša; Radosavljević, Aleksandra; Stanković, Sanja; Majkić-Singh, Nada (2011): „The Association of Lipoprotein Parameters and C-Reactive Protein in Patients with Age-Related Macular Degeneration“. In: *Ophthalmic Research*. 46 (3), S. 125–132.
- Crane, I J; Wallace, C A; McKillop-Smith, S; Forrester, J V (2000): „Control of chemokine production at the blood-retina barrier“. In: *Immunology*. 101 (3), S. 426–433.
- Damico, Francisco Max; Gasparin, Fabio; Scolari, Mariana Ramos; Pedral, Lycia Sampaio; Takahashi, Beatriz Sayuri (2012): „New approaches and potential treatments for dry age-related macular degeneration“. In: *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*. 75 (1), S. 71–76.
- Deshmane, Satish L; Kremlev, Sergey; Amini, Shohreh; Sawaya, Bassel E (2009): „Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview“. In: *Journal of interferon & cytokine research: the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*. 29 (6), S. 313–326.
- Devaraj, Sridevi; Kumaresan, Pappanaicken R; Jialal, Ishwarlal (2004): „Effect of C-reactive protein on chemokine expression in human aortic endothelial cells“. In: *Journal of molecular and cellular cardiology*. 36 (3), S. 405–410.

- Dewan, Andrew; Liu, Mugen; Hartman, Stephen; Zhang, Samuel Shao-Min; Liu, David T L; Zhao, Connie; Tam, Pancy O S; Chan, Wai Man; u. a. (2006): „HTRA1 promoter polymorphism in wet age-related macular degeneration“. In: *Science (New York, N.Y.)*. 314 (5801), S. 989–992.
- Dias, João Rafael de Oliveira; Rodrigues, Eduardo Büchele; Maia, Mauricio; Magalhães, Octaviano; Penha, Fernando Marcondes; Farah, Michel Eid (2011): „Cytokines in neovascular age-related macular degeneration: fundamentals of targeted combination therapy“. In: *British Journal of Ophthalmology*. 95 (12), S. 1631-1637.
- DOG; RG; BVA (2011): „Stellungnahme der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft, der Retinologischen Gesellschaft und des Berufsverbandes der Augenärzte Deutschlands zur Therapie der diabetischen Makulopathie“. In: *Der Ophthalmologe*. 108 (5), S. 485–500.
- Dong, Aling; Shen, Jikui; Zeng, MingBing; Campochiaro, Peter A (2011): „Vascular cell-adhesion molecule-1 plays a central role in the proangiogenic effects of oxidative stress“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108 (35), S. 14614–14619.
- Eliasson, Björn (2003): „Cigarette smoking and diabetes“. In: *Progress in cardiovascular diseases*. 45 (5), S. 405–413.
- Elner, S G; Strieter, R M; Elner, V M; Rollins, B J; Del Monte, M A; Kunkel, S L (1991): „Monocyte chemotactic protein gene expression by cytokine-treated human retinal pigment epithelial cells“. In: *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 64 (6), S. 819–825.
- Endo, H; Naito, T; Asahara, T; Kajima, M; Shiota, H (2000): „[Cytokines in the vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy--vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor are elevated in proliferative diabetic retinopathy]“. In: *Nihon Ganka Gakkai Zasshi*. 104 (10), S. 711–716.
- Endo, M; Yanagisawa, K; Tsuchida, K; Okamoto, T; Matsushita, T; Higuchi, M; Matsuda, A; Takeuchi, M; u. a. (2001): „Increased levels of vascular endothelial growth factor and advanced glycation end products in aqueous humor of patients with diabetic retinopathy“. In: *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme*. 33 (5), S. 317–322.
- Ergün, S; Kilic, N; Wurmbach, J H; Ebrahimnejad, A; Fernando, M; Sevinc, S; Kilic, E; Chalajour, F; u. a. (2001): „Endostatin inhibits angiogenesis by stabilization of newly formed endothelial tubes“. In: *Angiogenesis*. 4 (3), S. 193–206.
- Fauser, S.; Engelmann, K.; Krohne, T. U.; Lappas, A.; Kirchhof, B.; Joussen, A.M. (2003): „Pathogenese der choroidalen Neovaskularisation“. In: *Der Ophthalmologe*. 100 (4), S. 300–305.
- Fett, J W; Strydom, D J; Lobb, R R; Alderman, E M; Bethune, J L; Riordan, J F; Vallee, B L (1985): „Isolation and characterization of angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma cells“. In: *Biochemistry*. 24 (20), S. 5480–5486.

- Finger, Robert P.; Fimmers, Rolf; Holz, Frank G.; Scholl, Hendrik P. N. (2011): „Incidence of Blindness and Severe Visual Impairment in Germany: Projections for 2030“. In: *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 52 (7), S. 4381–4389.
- Forooghian, Farzin; Cukras, Catherine; Meyerle, Catherine B.; Chew, Emily Y.; Wong, Wai T. (2009): „Tachyphylaxis Following Intravitreal Bevacizumab for Exudative Age-Related Macular Degeneration“. In: *Retina (Philadelphia, Pa.)*. 29 (6), S. 723–731.
- Forrester, J V (2003): „Macrophages eyed in macular degeneration“. In: *Nature medicine*. 9 (11), S. 1350–1351.
- Frank, R N; Puklin, J E; Stock, C; Canter, L A (2000): „Race, iris color, and age-related macular degeneration“. In: *Transactions of the American Ophthalmological Society*. 98, S. 109–115; discussion 115–117.
- Fraser-Bell, Samantha; Kaines, Andrew; Hykin, Phillip G (2008): „Update on treatments for diabetic macular edema“. In: *Current opinion in ophthalmology*. 19 (3), S. 185–189.
- Funatsu, Hideharu; Noma, Hidetaka; Mimura, Tatsuya; Eguchi, Shuichiro; Hori, Sadao (2009): „Association of Vitreous Inflammatory Factors with Diabetic Macular Edema“. In: *Ophthalmology*. 116 (1), S. 73–79.
- Funatsu, Hideharu; Yamashita, Hidetoshi; Noma, Hidetaka; Mimura, Tatsuya; Nakamura, Shinko; Sakata, Kumi; Hori, Sadao (2005): „Aqueous humor levels of cytokines are related to vitreous levels and progression of diabetic retinopathy in diabetic patients“. In: *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. 243 (1), S. 3–8.
- Funatsu, Hideharu; Yamashita, Hidetoshi; Noma, Hidetaka; Mimura, Tatsuya; Yamashita, Tetsuji; Hori, Sadao (2002): „Increased levels of vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in the aqueous humor of diabetics with macular edema“. In: *American Journal of Ophthalmology*. 133 (1), S. 70–77.
- Funk, Marion; Karl, David; Georgopoulos, Michael; Benesch, Thomas; Sacu, Stefan; Polak, Kaija; Zlabinger, Gerhard J.; Schmidt-Erfurth, Ursula (2009): „Neovascular Age-related Macular Degeneration: Intraocular Cytokines and Growth Factors and the Influence of Therapy with Ranibizumab“. In: *Ophthalmology*. 116 (12), S. 2393–2399.
- Funk, Marion; Schmidinger, Gerald; Maar, Noemi; Bolz, Matthias; Benesch, Thomas; Zlabinger, Gerhard J.; Schmidt-Erfurth, Ursula M (2010): „Angiogenic and inflammatory markers in the intraocular fluid of eyes with diabetic macular edema and influence of therapy with bevacizumab“. In: *Retina (Philadelphia, Pa.)*. 30 (9), S. 1412–1419.
- Gao, Xiangwei; Xu, Zhengping (2008): „Mechanisms of action of angiogenin“. In: *Acta biochimica et biophysica Sinica*. 40 (7), S. 619–624.
- Gaudreault, Jacques; Fei, David; Beyer, Joseph C; Ryan, Anne; Rangell, Linda; Shiu, Vanessa; Damico, Lisa A (2007): „Pharmacokinetics and retinal distribution of ranibizumab, a humanized antibody fragment directed against VEGF-A, following intravitreal administration in rabbits“. In: *Retina (Philadelphia, Pa.)*. 27 (9), S. 1260–1266.

- Gaudreault, Jacques; Fei, David; Rusit, Jeriza; Suboc, Pamela; Shiu, Vanessa (2005): „Preclinical pharmacokinetics of Ranibizumab (rhuFabV2) after a single intravitreal administration“. In: *Investigative ophthalmology & visual science*. 46 (2), S. 726–733.
- Gershov, Debra; Kim, SunJung; Brot, Nathan; Elkon, Keith B. (2000): „C-Reactive Protein Binds to Apoptotic Cells, Protects the Cells from Assembly of the Terminal Complement Components, and Sustains an Antiinflammatory Innate Immune Response Implications for Systemic Autoimmunity“. In: *The Journal of Experimental Medicine*. 192 (9), S. 1353–1364.
- Gerste, Ronald D. (2012): „Trockene Makuladegeneration: Modulation des Sehzyklus“. In: *Deutsches Ärzteblatt*. 109 (3), A-90/ B-82/ C-82.
- Gervasini, Susanna (2009): *Wirkstoff im Profil - Ranibizumab*. 1. Auflage. München: Elsevier. — ISBN: 978-3-437-59902-6
- Goverdhan, S V; Ennis, S; Hannan, S R; Madhusudhana, K C; Cree, A J; Luff, A J; Lotery, A J (2008): „Interleukin-8 promoter polymorphism –251A/T is a risk factor for age-related macular degeneration“. In: *British Journal of Ophthalmology*. 92 (4), S. 537 – 540.
- Green, Douglas R.; Reed, John C. (1998): „Mitochondria and Apoptosis“. In: *Science*. 281 (5381), S. 1309–1312.
- Grehn, Franz (2008): *Augenheilkunde*. 30. Auflage. Heidelberg: Springer.
- Grijalba, M T; Vercesi, A E; Schreier, S (1999): „Ca²⁺-induced increased lipid packing and domain formation in submitochondrial particles. A possible early step in the mechanism of Ca²⁺-stimulated generation of reactive oxygen species by the respiratory chain“. In: *Biochemistry*. 38 (40), S. 13279–13287.
- Haddad, Stephen; Chen, Clara A; Santangelo, Susan L; Seddon, Johanna M (2006): „The genetics of age-related macular degeneration: a review of progress to date“. In: *Survey of ophthalmology*. 51 (4), S. 316–363.
- Hageman, Gregory S; Anderson, Don H; Johnson, Lincoln V; Hancox, Lisa S; Taiber, Andrew J; Hardisty, Lisa I; Hageman, Jill L; Stockman, Heather A; u. a. (2005): „A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102 (20), S. 7227–7232.
- Hammes, H.-P.; Bertram, B.; Bornfeld, N.; Danne, T.; Kroll, P.; Lemmen, K. D. (2004): „Diagnostik, Therapie und Verlaufskontrolle der diabetischen Retinopathie und Makulopathie“.
- Heidenkummer, H P; Kampik, A (1995): „[Surgical extraction of subretinal pseudotumors in age related macular degeneration. Clinical, morphologic and immunohistochemical results]“. In: *Der Ophthalmologe: Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft*. 92 (5), S. 631–639.

- Heiduschka, Peter; Fietz, Heike; Hofmeister, Sabine; Schultheiss, Sigrid; Mack, Andreas F.; Peters, Swaantje; Ziemssen, Focke; Niggemann, Birgit; u. a. (2007): „Penetration of Bevacizumab through the Retina after Intravitreal Injection in the Monkey“. In: *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 48 (6), S. 2814–2823.
- Hernández, C; Segura, R M; Fonollosa, A; Carrasco, E; Francisco, G; Simó, R (2005): „Interleukin-8, monocyte chemoattractant protein-1 and IL-10 in the vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy“. In: *Diabetic Medicine: A Journal of the British Diabetic Association*. 22 (6), S. 719–722.
- Higgins, Gareth T; Wang, Jiang Huai; Dockery, Peter; Cleary, Philip E; Redmond, H Paul (2003): „Induction of angiogenic cytokine expression in cultured RPE by ingestion of oxidized photoreceptor outer segments“. In: *Investigative ophthalmology & visual science*. 44 (4), S. 1775–1782.
- Ho, Lintje; van Leeuwen, Redmer; Witteman, Jacqueline C M; van Duijn, Cornelia M; Uitterlinden, André G; Hofman, Albert; de Jong, Paulus T V M; Vingerling, Johannes R; u. a. (2011): „Reducing the genetic risk of age-related macular degeneration with dietary antioxidants, zinc, and ω -3 fatty acids: the Rotterdam study“. In: *Archives of ophthalmology*. 129 (6), S. 758–766.
- Hoeben, Ann; Landuyt, Bart; Highley, Martin S.; Wildiers, Hans; Oosterom, Allan T. Van; Bruijn, Ernst A. De (2004): „Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis“. In: *Pharmacological Reviews*. 56 (4), S. 549–580.
- Hogg, Ruth E.; Woodside, Jayne V.; Gilchrist, Sarah E.C.M.; Graydon, Ryan; Fletcher, Astrid E.; Chan, Wing; Knox, Angela; Cartmill, Barry; u. a. (2008): „Cardiovascular Disease and Hypertension Are Strong Risk Factors for Choroidal Neovascularization“. In: *Ophthalmology*. 115 (6), S. 1046–1052.e2.
- Holekamp, Nancy M; Bouck, Noel; Volpert, Olga (2002): „Pigment epithelium-derived factor is deficient in the vitreous of patients with choroidal neovascularization due to age-related macular degeneration“. In: *American Journal of Ophthalmology*. 134 (2), S. 220–227.
- Holtkamp, G M; Van Rossem, M; de Vos, A F; Willekens, B; Peek, R; Kijlstra, A (1998): „Polarized secretion of IL-6 and IL-8 by human retinal pigment epithelial cells“. In: *Clinical and experimental immunology*. 112 (1), S. 34–43.
- Holz, F G; Helb, H M; Bindewald-Wittich, A; Scholl, H P N (2006): „Modern pharmacotherapy of age-related macular degeneration“. In: *Der Internist*. 47 (2), S. 192–198.
- Hong, Kyung Hee; Ryu, Jewon; Han, Ki Hoon (2005): „Monocyte chemoattractant protein-1-induced angiogenesis is mediated by vascular endothelial growth factor-A“. In: *Blood*. 105 (4), S. 1405–1407.
- Hong, Thomas; Tan, Ava Grace; Mitchell, Paul; Wang, Jie Jin (2011): „A review and meta-analysis of the association between C-reactive protein and age-related macular degeneration“. In: *Survey of ophthalmology*. 56 (3), S. 184–194.

- Hyodo, I; Doi, T; Endo, H; Hosokawa, Y; Nishikawa, Y; Tanimizu, M; Jinno, K; Kotani, Y (1998): „Clinical significance of plasma vascular endothelial growth factor in gastrointestinal cancer“. In: *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*. 34 (13), S. 2041–2045.
- Izumi-Nagai, Kanako; Nagai, Norihiro; Ozawa, Yoko; Mihara, Masahiko; Ohsugi, Yoshiyuki; Kurihara, Toshihide; Koto, Takashi; Satofuka, Shingo; u. a. (2007): „Interleukin-6 Receptor-Mediated Activation of Signal Transducer and Activator of Transcription-3 (STAT3) Promotes Choroidal Neovascularization“. In: *The American Journal of Pathology*. 170 (6), S. 2149–2158.
- Jakeman, L B; Armanini, M; Phillips, H S; Ferrara, N (1993): „Developmental expression of binding sites and messenger ribonucleic acid for vascular endothelial growth factor suggests a role for this protein in vasculogenesis and angiogenesis“. In: *Endocrinology*. 133 (2), S. 848–859.
- Jin, K L; Mao, X O; Greenberg, D A (2000): „Vascular endothelial growth factor: direct neuroprotective effect in in vitro ischemia“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97 (18), S. 10242–10247.
- Jo, Nobuo; Mailhos, Carolina; Ju, Meihua; Cheung, Eunice; Bradley, John; Nishijima, Kazuaki; Robinson, Gregory S; Adamis, Anthony P; u. a. (2006): „Inhibition of platelet-derived growth factor B signaling enhances the efficacy of anti-vascular endothelial growth factor therapy in multiple models of ocular neovascularization“. In: *The American journal of pathology*. 168 (6), S. 2036–2053.
- Jonas, Jost B; Neumaier, Michael (2007): „Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in exudative age-related macular degeneration and diffuse diabetic macular edema“. In: *Ophthalmic Research*. 39 (3), S. 139–142.
- Jonas, Jost B; Tao, Yong; Neumaier, Michael; Findeisen, Peter (2012): „Cytokine concentration in aqueous humour of eyes with exudative age-related macular degeneration“. In: *Acta ophthalmologica*. 90 (5), S. e381–388.
- Jonas, Jost B; Tao, Yong; Neumaier, Michael; Findeisen, Peter (2010): „Monocyte chemoattractant protein 1, intercellular adhesion molecule 1, and vascular cell adhesion molecule 1 in exudative age-related macular degeneration“. In: *Archives of Ophthalmology*. 128 (10), S. 1281–1286.
- De Jong, Paulus T.V.M. (2006): „Age-Related Macular Degeneration“. In: *New England Journal of Medicine*. 355 (14), S. 1474–1485.
- Joussen, A M; Murata, T; Tsujikawa, A; Kirchhof, B; Bursell, S E; Adamis, A P (2001): „Leukocyte-mediated endothelial cell injury and death in the diabetic retina“. In: *The American journal of pathology*. 158 (1), S. 147–152.
- Juel, Helene B.; Kaestel, Charlotte; Folkersen, Lasse; Faber, Carsten; Heegaard, Niels H.H.; Borup, Rehannah; Nissen, Mogens H. (2011): „Retinal pigment epithelial cells upregulate expression of complement factors after co-culture with activated T cells“. In: *Experimental Eye Research*. 92 (3), S. 180–188.

- Kabbinavar, Fairouz; Hurwitz, Herbert I; Fehrenbacher, Louis; Meropol, Neal J; Novotny, William F; Lieberman, Grazyna; Griffing, Susan; Bergsland, Emily (2003): „Phase II, randomized trial comparing bevacizumab plus fluorouracil (FU)/leucovorin (LV) with FU/LV alone in patients with metastatic colorectal cancer“. In: *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 21 (1), S. 60–65.
- Kamoi, Kyuzi; Takeda, Keiji; Hashimoto, Kaoru; Tanaka, Reiko; Okuyama, Shinya (2013): „Identifying risk factors for clinically significant diabetic macula edema in patients with type 2 diabetes mellitus“. In: *Current diabetes reviews*. 9 (3), S. 209–217.
- Kanda, Atsuhiko; Abecasis, Goncalo; Swaroop, Anand (2008): „Inflammation in the pathogenesis of age-related macular degeneration“. In: *British Journal of Ophthalmology*. 92 (4), S. 448–450.
- Kaul, Kirti; Hodgkinson, Andrea; Tarr, J M; Kohner, Eva M; Chibber, Rakesh (2010): „Is inflammation a common retinal-renal-nerve pathogenic link in diabetes?“. In: *Current diabetes reviews*. 6 (5), S. 294–303.
- Keane, Pearse A; Chang, Karen T; Liakopoulos, Sandra; Jivrajka, Renu V; Walsh, Alexander C; Sadda, Srinivas R (2009): „Effect of ranibizumab retreatment frequency on neurosensory retinal volume in neovascular amd“. In: *Retina (Philadelphia, Pa.)*. 29 (5), S. 592–600.
- Keane, Pearse A; Liakopoulos, Sandra; Ongchin, Sharel C; Heussen, Florian M; Msutta, Sandeep; Chang, Karen T; Walsh, Alexander C; Sadda, Srinivas R (2008): „Quantitative subanalysis of optical coherence tomography after treatment with ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration“. In: *Investigative ophthalmology & visual science*. 49 (7), S. 3115–3120.
- Keane, Pearse A.; Tufail, Adnan; Patel, Praveen J. (2011): „Management of Neovascular Age-Related Macular Degeneration in Clinical Practice: Initiation, Maintenance, and Discontinuation of Therapy“. In: *Journal of Ophthalmology*. 2011 , DOI: 10.1155/2011/752543.
- Kent, David; Sheridan, Carl (2003): „Choroidal neovascularization: a wound healing perspective“. In: *Molecular vision*. 9 , S. 747–755.
- Kernt, M; Neubauer, A S; Liegl, R G; Hirneiss, C; Alge, C S; Wolf, A; Ulbig, M W; Kampik, A (2010): „Sorafenib prevents human retinal pigment epithelium cells from light-induced overexpression of VEGF, PDGF and PlGF“. In: *British Journal of Ophthalmology*. 94 (11), S. 1533 –1539.
- Kikuchi, Masato; Nakamura, Makoto; Ishikawa, Kohei; Suzuki, Toshimitsu; Nishihara, Hiroaki; Yamakoshi, Tomomi; Nishio, Kazuko; Taki, Kentaro; u. a. (2007): „Elevated C-reactive protein levels in patients with polypoidal choroidal vasculopathy and patients with neovascular age-related macular degeneration“. In: *Ophthalmology*. 114 (9), S. 1722–1727.

- Kinnunen, Kati; Petrovski, Goran; Moe, Morten C; Berta, András; Kaarniranta, Kai (2012): „Molecular mechanisms of retinal pigment epithelium damage and development of age-related macular degeneration“. In: *Acta ophthalmologica*. 90 (4), S. 299–309.
- Klagsbrun, M; D'Amore, P A (1996): „Vascular endothelial growth factor and its receptors“. In: *Cytokine & growth factor reviews*. 7 (3), S. 259–270.
- Klaver, C C; Kliffen, M; van Duijn, C M; Hofman, A; Cruts, M; Grobbee, D E; van Broeckhoven, C; de Jong, P T (1998): „Genetic association of apolipoprotein E with age-related macular degeneration“. In: *American journal of human genetics*. 63 (1), S. 200–206.
- Klein, R; Klein, B E; Moss, S E; Cruickshanks, K J (1995): „The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. XV. The long-term incidence of macular edema“. In: *Ophthalmology*. 102 (1), S. 7–16.
- Klein, Robert J; Zeiss, Caroline; Chew, Emily Y; Tsai, Jen-Yue; Sackler, Richard S; Haynes, Chad; Henning, Alice K; SanGiovanni, John Paul; u. a. (2005): „Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration“. In: *Science (New York, N.Y.)*. 308 (5720), S. 385–389.
- Klein, Ronald; Klein, Barbara E.K.; Knudtson, Michael D.; Wong, Tien Yin; Shankar, Anoop; Tsai, Michael Y. (2005): „Systemic Markers of Inflammation, Endothelial Dysfunction, and Age-Related Maculopathy“. In: *American Journal of Ophthalmology*. 140 (1), S. 35–44.
- Knauer, C; Pfeiffer, N (2006): „[Blindness in Germany--today and in 2030]“. In: *Der Ophthalmologe: Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft*. 103 (9), S. 735–741.
- Koleva-Georgieva, Desislava N; Sivkova, Nelly P; Terzieva, Dora (2011): „Serum inflammatory cytokines IL-1beta, IL-6, TNF-alpha and VEGF have influence on the development of diabetic retinopathy“. In: *Folia medica*. 53 (2), S. 44–50.
- Kramer, Michal; Hasanreisoglu, Murat; Feldman, Anna; Siegel, Ruth Axer; Sonis, Paulina; Maharshak, Idit; Monselise, Yehudit; Gurevich, Michael; u. a. (2011): „Monocyte chemoattractant protein-1 in the aqueous humor of patients with age-related macular degeneration“. In: *Clinical & Experimental Ophthalmology*., DOI: 10.1111/j.1442-9071.2011.02747.x.
- Krohne, Tim U; Liu, Zengping; Holz, Frank G; Meyer, Carsten H (2012): „Intraocular pharmacokinetics of ranibizumab following a single intravitreal injection in humans“. In: *American journal of ophthalmology*. 154 (4), S. 682–686.e2.
- Kwak, Nohoon; Okamoto, Naoyuki; Wood, Jeanette M.; Campochiaro, Peter A. (2000): „VEGF Is Major Stimulator in Model of Choroidal Neovascularization“. In: *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 41 (10), S. 3158–3164.
- Lal, B K; Varma, S; Pappas, P J; Hobson, R W, 2nd; Durán, W N (2001): „VEGF increases permeability of the endothelial cell monolayer by activation of PKB/akt, endothelial

- nitric-oxide synthase, and MAP kinase pathways“. In: *Microvascular research*. 62 (3), S. 252–262.
- Lang, Gerhard K. (2004): *Augenheilkunde*. 3. Auflage. Stuttgart, New York: Thieme.
- Van Leeuwen, Redmer; Boekhoorn, Sharmila; Vingerling, Johannes R; Witteman, Jacqueline C M; Klaver, Caroline C W; Hofman, Albert; de Jong, Paulus T V M (2005): „Dietary intake of antioxidants and risk of age-related macular degeneration“. In: *JAMA: the journal of the American Medical Association*. 294 (24), S. 3101–3107.
- Li, Aihua; Dubey, Seema; Varney, Michelle L.; Dave, Bhavana J.; Singh, Rakesh K. (2003): „IL-8 Directly Enhanced Endothelial Cell Survival, Proliferation, and Matrix Metalloproteinases Production and Regulated Angiogenesis“. In: *The Journal of Immunology*. 170 (6), S. 3369–3376.
- Liang, Fong-Qi; Godley, Bernard F (2003): „Oxidative stress-induced mitochondrial DNA damage in human retinal pigment epithelial cells: a possible mechanism for RPE aging and age-related macular degeneration“. In: *Experimental Eye Research*. 76 (4), S. 397–403.
- Lim, Ji W; Han, Jae R (2011): „Aqueous humour levels of vascular endothelial growth factor and erythropoietin in patients with diabetic macular oedema before and after intravitreal erythropoietin injection“. In: *Clinical & Experimental Ophthalmology*. 39 (6), S. 537–544.
- Lim, Moon Y; Wang, Hui; Kapoun, Ann M; O’connell, Maile; O’Young, Gilbert; Brauer, Heather Ann; Luedtke, Gregory R; Chakravarty, Sarvajit; u. a. (2004): „p38 Inhibition attenuates the pro-inflammatory response to C-reactive protein by human peripheral blood mononuclear cells“. In: *Journal of molecular and cellular cardiology*. 37 (6), S. 1111–1114.
- Lip, Peck-Lin; Blann, Andrew D.; Hope-Ross, Monique; Gibson, Jonathan M.; Lip, Gregory Y. H. (2001): „Age-related macular degeneration is associated with increased vascular endothelial growth factor, hemorheology and endothelial dysfunction“. In: *Ophthalmology*. 108 (4), S. 705–710.
- Loeffler, M; Kroemer, G (2000): „The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita“. In: *Experimental cell research*. 256 (1), S. 19–26.
- Machalińska, Anna; Paczkowska, Edyta; Pabin, Tomasz; Safranow, Krzysztof; Karczewicz, Danuta; Machaliński, Bogusław (2011): „Influence of ranibizumab on vascular endothelial growth factor plasma level and endothelial progenitor cell mobilization in age-related macular degeneration patients: safety of intravitreal treatment for vascular homeostasis“. In: *Journal of ocular pharmacology and therapeutics: the official journal of the Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics*. 27 (5), S. 471–475.
- Maier, Richard; Weger, Martin; Haller-Schober, Eva-Maria; El-Shabrawi, Yosuf; Wedrich, Andreas; Theisl, Anna; Aigner, Reingard; Barth, Alfred; u. a. (2008): „Multiplex bead analysis of vitreous and serum concentrations of inflammatory and proangiogenic

- factors in diabetic patients“. In: *Molecular Vision, biology and genetics in vision research*. 14, S. 637-643.
- Marneros, Alexander G.; She, Haicheng; Zambarakji, Hadi; Hashizume, Hiroya; Connolly, Edward J.; Kim, Ivana; Gragoudas, Evangelos S.; Miller, Joan W.; u. a. (2007): „Endogenous endostatin inhibits choroidal neovascularization“. In: *The FASEB Journal*. 21 (14), S. 3809–3818.
- Meyer-Rüsenberg, Birthe (2010): „Systemische VEGF-Werte vor und während intravitrealer Ranibizumab (Lucentis®) -Therapie“. In: Freiburg i. Br.: Düsseldorf: German Medical Science GMS Publishing House, DOI: 10.3205/1Org20.
- Meyers, S M (1994): „A twin study on age-related macular degeneration“. In: *Transactions of the American Ophthalmological Society*. 92 , S. 775–843.
- Miao, Heng; Tao, Yong; Li, Xiao-xin (2012): „Inflammatory cytokines in aqueous humor of patients with choroidal neovascularization“. In: *Molecular vision*. 18 , S. 574–580.
- Mizukami, Yusuke; Jo, Won-Seok; Duerr, Eva-Maria; Gala, Manish; Li, Jingnan; Zhang, Xiaobo; Zimmer, Michael A; Iliopoulos, Othon; u. a. (2005): „Induction of interleukin-8 preserves the angiogenic response in HIF-1alpha-deficient colon cancer cells“. In: *Nature Medicine*. 11 (9), S. 992–997.
- Monti, F; Bellan, B; Peruccio, C; Berardi, S (1976): „The clinical picture of diabetic retinopathy in the dog“. In: *Folia veterinaria Latina*. 6 (3), S. 249–274.
- Mousa, S A; Lorelli, W; Campochiaro, P A (1999): „Role of hypoxia and extracellular matrix-integrin binding in the modulation of angiogenic growth factors secretion by retinal pigmented epithelial cells“. In: *Journal of cellular biochemistry*. 74 (1), S. 135–143.
- Muether, Philipp S; Neuhaus, Irmgard; Buhl, Christoph; Hermann, Manuel M; Kirchhof, Bernd; Fauser, Sascha (2013): „INTRAOCULAR GROWTH FACTORS AND CYTOKINES IN PATIENTS WITH DRY AND NEOVASCULAR AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION“. In: *Retina (Philadelphia, Pa.)*, DOI: 10.1097/IAE.0b013e318285cd9e.
- Muether, Philipp S.; Hermann, Manuel M.; Viebahn, Ulrike; Kirchhof, Bernd; Fauser, Sascha (2012): „Vascular Endothelial Growth Factor in Patients with Exudative Age-related Macular Degeneration Treated with Ranibizumab“. In: *Ophthalmology*. 119 (10), S. 2082–2086.
- Mullins, Robert F; Skeie, Jessica M; Malone, Elizabeth A; Kuehn, Markus H (2006): „Macular and peripheral distribution of ICAM-1 in the human choriocapillaris and retina“. In: *Molecular Vision*. 12 , S. 224–235.
- Murata, M; Kador, P F; Sato, S (2000): „Vascular endothelial growth factor (VEGF) enhances the expression of receptors and activates mitogen-activated protein (MAP) kinase of dog retinal capillary endothelial cells“. In: *Journal of ocular pharmacology and therapeutics: the official journal of the Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics*. 16 (4), S. 383–391.

- Nakazawa, Toru; Hisatomi, Toshio; Nakazawa, Chifuyu; Noda, Kosuke; Maruyama, Kazuichi; She, Haicheng; Matsubara, Akihisa; Miyahara, Shinsuke; u. a. (2007): „Monocyte chemoattractant protein 1 mediates retinal detachment-induced photoreceptor apoptosis“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104 (7), S. 2425–2430.
- Nishijima, Kazuaki; Ng, Yin-Shan; Zhong, Lichun; Bradley, John; Schubert, William; Jo, Nobuo; Akita, Jo; Samuelsson, Steven J; u. a. (2007): „Vascular endothelial growth factor-A is a survival factor for retinal neurons and a critical neuroprotectant during the adaptive response to ischemic injury“. In: *The American journal of pathology*. 171 (1), S. 53–67.
- Noda, Kousuke; Miyahara, Shinsuke; Nakazawa, Toru; Almulki, Lama; Nakao, Shintaro; Hisatomi, Toshio; She, Haicheng; Thomas, Kennard L; u. a. (2008a): „Inhibition of vascular adhesion protein-1 suppresses endotoxin-induced uveitis“. In: *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 22 (4), S. 1094–1103.
- Noda, Kousuke; She, Haicheng; Nakazawa, Toru; Hisatomi, Toshio; Nakao, Shintaro; Almulki, Lama; Zandi, Souska; Miyahara, Shinsuke; u. a. (2008b): „Vascular adhesion protein-1 blockade suppresses choroidal neovascularization“. In: *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 22 (8), S. 2928–2935.
- Noh, Yun-Hee; Matsuda, Kant; Hong, Young-Kwon; Kunstfeld, Rainer; Riccardi, Lucia; Koch, Manuel; Oura, Hajimu; Dadras, Soheil S; u. a. (2003): „An N-terminal 80 kDa recombinant fragment of human thrombospondin-2 inhibits vascular endothelial growth factor induced endothelial cell migration in vitro and tumor growth and angiogenesis in vivo“. In: *The Journal of investigative dermatology*. 121 (6), S. 1536–1543.
- Noma, H.; Funatsu, H.; Yamasaki, M.; Tsukamoto, H.; Mimura, T.; Sone, T.; Hirayama, T.; Tamura, H.; u. a. (2008): „Aqueous humour levels of cytokines are correlated to vitreous levels and severity of macular oedema in branch retinal vein occlusion“. In: *Eye*. 22 (1), S. 42–48.
- Noma, Hidetaka; Funatsu, Hideharu; Mimura, Tatsuya; Harino, Seiyo; Hori, Sadao (2010): „Aqueous humor levels of vasoactive molecules correlate with vitreous levels and macular edema in central retinal vein occlusion“. In: *European journal of ophthalmology*. 20 (2), S. 402–409.
- Oh, H; Takagi, H; Takagi, C; Suzuma, K; Otani, A; Ishida, K; Matsumura, M; Ogura, Y; u. a. (1999): „The potential angiogenic role of macrophages in the formation of choroidal neovascular membranes“. In: *Investigative ophthalmology & visual science*. 40 (9), S. 1891–1898.
- Oh, In Kyung; Kim, Seong-Woo; Oh, Jaeryung; Lee, Tae Soo; Huh, Kuhl (2010): „Inflammatory and Angiogenic Factors in the Aqueous Humor and the Relationship to Diabetic Retinopathy“. In: *Current Eye Research*. 35 , S. 1116–1127.

- Ohr, Matthew; Kaiser, Peter K (2012): „Intravitreal aflibercept injection for neovascular (wet) age-related macular degeneration“. In: *Expert opinion on pharmacotherapy*. 13 (4), S. 585–591.
- Park, J E; Keller, G A; Ferrara, N (1993): „The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF“. In: *Molecular biology of the cell*. 4 (12), S. 1317–1326.
- Park, Yong Wook; Kang, Young Mo; Butterfield, Joe; Detmar, Michael; Goronzy, Jörg J; Weyand, Cornelia M (2004): „Thrombospondin 2 functions as an endogenous regulator of angiogenesis and inflammation in rheumatoid arthritis“. In: *The American journal of pathology*. 165 (6), S. 2087–2098.
- Patel, Mrinali; Chan, Chi-Chao (2008): „Immunopathological aspects of age-related macular degeneration“. In: *Seminars in immunopathology*. 30 (2), S. 97–110.
- Patel, N; Adewoyin, T; Chong, N V (2008): „Age-related macular degeneration: a perspective on genetic studies“. In: *Eye (London, England)*. 22 (6), S. 768–776.
- Peri, G; Chiaffarino, F; Bernasconi, S; Padura, I M; Mantovani, A (1990): „Cytotoxicity of activated monocytes on endothelial cells“. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. 144 (4), S. 1444–1448.
- Pollreisz, Andreas; Funk, Marion; Breitwieser, Florian P; Parapatics, Katja; Sacu, Stefan; Georgopoulos, Michael; Dunavoelgyi, Roman; Zlabinger, Gerhard J; u. a. (2013): „Quantitative proteomics of aqueous and vitreous fluid from patients with idiopathic epiretinal membranes“. In: *Experimental eye research*. 108 , S. 48–58.
- Pons, Marianne; Marin-Castaño, Maria E. (2011): „Cigarette Smoke-Related Hydroquinone Dysregulates MCP-1, VEGF and PEDF Expression in Retinal Pigment Epithelium in Vitro and in Vivo“. In: *PLoS ONE*. 6 (2), S. e16722, DOI: 10.1371/journal.pone.0016722.
- Qaum, Tamim; Xu, Qingwen; Joussen, Antonia M.; Clemens, Mark W.; Qin, Wenying; Miyamoto, Kazuaki; Hassessian, Haroutioun; Wiegand, Stanley J.; u. a. (2001): „VEGF-initiated Blood–Retinal Barrier Breakdown in Early Diabetes“. In: *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 42 (10), S. 2408–2413.
- Ramrattan, R S; van der Schaft, T L; Mooy, C M; de Bruijn, W C; Mulder, P G; de Jong, P T (1994): „Morphometric analysis of Bruch’s membrane, the choriocapillaris, and the choroid in aging“. In: *Investigative ophthalmology & visual science*. 35 (6), S. 2857–2864.
- Rangasamy, Sampathkumar; McGuire, Paul G; Das, Arup (2012): „Diabetic retinopathy and inflammation: novel therapeutic targets“. In: *Middle East African journal of ophthalmology*. 19 (1), S. 52–59.
- Reff, Mitchell E; Hariharan, Kandasamy; Braslawsky, Gary (2002): „Future of monoclonal antibodies in the treatment of hematologic malignancies“. In: *Cancer control: journal of the Moffitt Cancer Center*. 9 (2), S. 152–166.

- Regillo, Carl D.; Brown, David M.; Abraham, Prema; Yue, Huibin; Ianchulev, Tsontcho; Schneider, Susan; Shams, Naveed; The PIER Study Group (2008): „Randomized, Double-Masked, Sham-Controlled Trial of Ranibizumab for Neovascular Age-related Macular Degeneration: PIER Study Year 1“. In: *American Journal of Ophthalmology*. 145 (2), S. 239–248.
- Rennekampff, H O; Hansbrough, J F; Kiessig, V; Doré, C; Sticherling, M; Schröder, J M (2000): „Bioactive interleukin-8 is expressed in wounds and enhances wound healing“. In: *The Journal of surgical research*. 93 (1), S. 41–54.
- Risau, W (1994): „Angiogenesis and endothelial cell function“. In: *Arzneimittel-Forschung*. 44 (3A), S. 416–417.
- Roberts, W. G.; Palade, G. E. (1995): „Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor“. In: *Journal of Cell Science*. 108 (6), S. 2369–2379.
- Roh, Mi In; Kim, Hong Suk; Song, Ji Hun; Lim, Jong Baek; Koh, Hyoung Jun; Kwon, Oh Woong (2009): „CONCENTRATION OF CYTOKINES IN THE AQUEOUS HUMOR OF PATIENTS WITH NAIVE, RECURRENT AND REGRESSED CNV ASSOCIATED WITH AMD AFTER BEVACIZUMAB TREATMENT“. In: *Retina*. 29 (4), S. 523–529.
- Rudnicka, Alicja R; Jarrar, Zakariya; Wormald, Richard; Cook, Derek G; Fletcher, Astrid; Owen, Christopher G (2012): „Age and gender variations in age-related macular degeneration prevalence in populations of European ancestry: a meta-analysis“. In: *Ophthalmology*. 119 (3), S. 571–580.
- Sakurai, Eiji; Taguchi, Hogara; Anand, Akshay; Ambati, Balamurali K; Gragoudas, Evangelos S; Miller, Joan W; Adamis, Anthony P; Ambati, Jayakrishna (2003): „Targeted disruption of the CD18 or ICAM-1 gene inhibits choroidal neovascularization“. In: *Investigative ophthalmology & visual science*. 44 (6), S. 2743–2749.
- Sandberg, Christina A; Herring, Ian P; Huckle, William R; LeRoith, Tanya; Pickett, J Phillip; Rossmeisl, John H (2012): „Aqueous humor vascular endothelial growth factor in dogs: association with intraocular disease and the development of pre-iridal fibrovascular membrane“. In: *Veterinary ophthalmology*. 15 Suppl 1, S. 21–30.
- Sawada, Osamu; Miyake, Taichiro; Kakinoki, Masashi; Sawada, Tomoko; Kawamura, Hajime; Ohji, Masahito (2010): „AQUEOUS VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR AFTER INTRAVITREAL INJECTION OF PEGAPTANIB OR RANIBIZUMAB IN PATIENTS WITH AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION“. In: *Retina*. 30 (7), S. 1034–1038.
- Schaal, Shlomit; Kaplan, Henry J; Tezel, Tongalp H (2008): „Is there tachyphylaxis to intravitreal anti-vascular endothelial growth factor pharmacotherapy in age-related macular degeneration?“. In: *Ophthalmology*. 115 (12), S. 2199–2205.
- Schaumberg, Debra A.; Christen, William G.; Buring, Julie E.; Glynn, Robert J.; Rifai, Nader; Ridker, Paul M. (2007): „High-Sensitivity C-Reactive Protein, Other Markers of

- Inflammation, and the Incidence of Macular Degeneration in Women“. In: *Arch Ophthalmol.* 125 (3), S. 300–305.
- Schlingemann, Reinier O (2004): „Role of growth factors and the wound healing response in age-related macular degeneration“. In: *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology = Albrecht Von Graefes Archiv Für Klinische Und Experimentelle Ophthalmologie.* 242 (1), S. 91–101.
- Schmucker, Christine; Ehlken, Christoph; Hansen, Lutz L; Antes, Gerd; Agostini, Hansjuergen T; Lelgemann, Monika (2010): „Intravitreal bevacizumab (Avastin) vs. ranibizumab (Lucentis) for the treatment of age-related macular degeneration: a systematic review“. In: *Current Opinion in Ophthalmology.* 21 (3), S. 218–226.
- Scholl, H P N; Weber, B H F; Nöthen, M M; Wienker, T; Holz, F G (2005): „[Y402H polymorphism in complement factor H and age-related macula degeneration (AMD)]“. In: *Der Ophthalmologe: Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft.* 102 (11), S. 1029–1035.
- Schutt, Florian; Bergmann, Marion; Holz, Frank G.; Kopitz, Jurgen (2003): „Proteins Modified by Malondialdehyde, 4-Hydroxynonenal, or Advanced Glycation End Products in Lipofuscin of Human Retinal Pigment Epithelium“. In: *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 44 (8), S. 3663–3668.
- Seddon, Johanna M; Gensler, Gary; Milton, Roy C; Klein, Michael L; Rifai, Nader (2004): „Association between C-reactive protein and age-related macular degeneration“. In: *JAMA: The Journal of the American Medical Association.* 291 (6), S. 704–710.
- Seddon, Johanna M.; George, Sarah; Rosner, Bernard; Rifai, Nader (2005): „Progression of Age-Related Macular Degeneration: Prospective Assessment of C-Reactive Protein, Interleukin 6, and Other Cardiovascular Biomarkers“. In: *Arch Ophthalmol.* 123 (6), S. 774–782.
- Shanmugam, Narkunarajaa; Figarola, James L.; Li, Yan; Swiderski, Piotr M.; Rahbar, Samual; Natarajan, Rama (2008): „Proinflammatory Effects of Advanced Lipoxidation End Products in Monocytes“. In: *Diabetes.* 57 (4), S. 879–888.
- Shen, W Y; Yu, M J; Barry, C J; Constable, I J; Rakoczy, P E (1998): „Expression of cell adhesion molecules and vascular endothelial growth factor in experimental choroidal neovascularisation in the rat“. In: *The British journal of ophthalmology.* 82 (9), S. 1063–1071.
- Shibuya, Masabumi (2011): „Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies“. In: *Genes & cancer.* 2 (12), S. 1097–1105.
- Shinoda, K; Ishida, S; Kawashima, S; Wakabayashi, T; Matsuzaki, T; Takayama, M; Shinmura, K; Yamada, M (1999): „Comparison of the levels of hepatocyte growth factor and vascular endothelial growth factor in aqueous fluid and serum with grades of retinopathy in patients with diabetes mellitus“. In: *The British Journal of Ophthalmology.* 83 (7), S. 834–837.

- Skeie, J M; Mullins, R F (2009): „Macrophages in neovascular age-related macular degeneration: friends or foes?“. In: *Eye (London, England)*. 23 (4), S. 747–755.
- Skeie, Jessica M; Fingert, John H; Russell, Stephen R; Stone, Edwin M; Mullins, Robert F (2010): „Complement component C5a activates ICAM-1 expression on human choroidal endothelial cells“. In: *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 51 (10), S. 5336–5342.
- Skeie, Jessica M.; Zeng, Shemin; Faidley, Elizabeth A.; Mullins, Robert F. (2011): „Angiogenin in age-related macular degeneration“. In: *Molecular Vision*. 17, S. 576–582.
- Sohn, Hee Jin; Han, Dae Heon; Kim, Im Tae; Oh, In Kyung; Kim, Kyun Hyung; Lee, Dae Yeong; Nam, Dong Heun (2011): „Changes in Aqueous Concentrations of Various Cytokines After Intravitreal Triamcinolone vs Bevacizumab for Diabetic Macular Edema“. In: *American Journal of Ophthalmology*. 152 (4), S. 686-694.
- Soncin, F (1992): „Angiogenin supports endothelial and fibroblast cell adhesion.“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 89 (6), S. 2232–2236.
- Stalmans, I (2005): „Role of the vascular endothelial growth factor isoforms in retinal angiogenesis and DiGeorge syndrome“. In: *Verhandelingen - Koninklijke Academie voor Geneeskunde van België*. 67 (4), S. 229–276.
- Sun, Yunjuan; Jin, Kunlin; Xie, Lin; Childs, Jocelyn; Mao, Xiao Ou; Logvinova, Anna; Greenberg, David A (2003): „VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia“. In: *The Journal of clinical investigation*. 111 (12), S. 1843–1851.
- Takahashi, Hiroyuki; Shibuya, Masabumi (2005): „The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions“. In: *Clinical science (London, England: 1979)*. 109 (3), S. 227–241.
- Tashimo, A.; Mitamura, Y.; Nagai, S.; Nakamura, Y.; Ohtsuka, K.; Mizue, Y.; Nishihira, J. (2004): „Aqueous levels of macrophage migration inhibitory factor and monocyte chemotactic protein-1 in patients with diabetic retinopathy“. In: *Diabetic Medicine*. 21 (12), S. 1292–1297.
- Tatar, O; Shinoda, K; Kaiserling, E; Claes, C; Eckardt, C; Eckert, T; Pertile, G; Boeyden, V; u. a. (2009): „Implications of bevacizumab on vascular endothelial growth factor and endostatin in human choroidal neovascularisation“. In: *British Journal of Ophthalmology*. 93 (2), S. 159 –165.
- Tatar, Olcay; Shinoda, Kei; Adam, Annemarie; Rohrbach, Jens Martin; Lucke, Klaus; Henke-Fahle, Sigrid; Bartz-Schmidt, Karl Ulrich; Grisanti, Salvatore (2006): „Expression of endostatin in human choroidal neovascular membranes secondary to age-related macular degeneration“. In: *Experimental Eye Research*. 83 (2), S. 329–338.
- Taub, D D; Oppenheim, J J (1994): „Chemokines, inflammation and the immune system“. In: *Therapeutic immunology*. 1 (4), S. 229–246.

- Thiele, Geoffrey M; Duryee, Michael J; Willis, Monte S; Sorrell, Michael F; Freeman, Thomas L; Tuma, Dean J; Klassen, Lynell W (2004): „Malondialdehyde-acetaldehyde (MAA) modified proteins induce pro-inflammatory and pro-fibrotic responses by liver endothelial cells“. In: *Comparative Hepatology*. 3 (Suppl 1), S. S25.
- Tsai, Der-Chong; Charng, Min-Ji; Lee, Fenq-Lih; Hsu, Wen-Ming; Chen, Shih-Jen (2006): „Different plasma levels of vascular endothelial growth factor and nitric oxide between patients with choroidal and retinal neovascularization“. In: *Ophthalmologica. Journal International D'ophtalmologie. International Journal of Ophthalmology. Zeitschrift Für Augenheilkunde*. 220 (4), S. 246–251.
- Uno, K; Bhutto, I A; McLeod, D S; Merges, C; Luty, G A (2006): „Impaired expression of thrombospondin-1 in eyes with age related macular degeneration“. In: *The British Journal of Ophthalmology*. 90 (1), S. 48–54.
- Valdes, Gloria; Kaufmann, Peter; Corthorn, Jenny; Erices, Rafaela; Brosnihan, K Bridget; Joyner-Grantham, JaNae (2009): „Vasodilator factors in the systemic and local adaptations to pregnancy“. In: *Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E*. 7 , S. 79.
- Vingerling, J R; Hofman, A; Grobbee, D E; de Jong, P T (1996): „Age-related macular degeneration and smoking. The Rotterdam Study“. In: *Archives of ophthalmology*. 114 (10), S. 1193–1196.
- Wang, W; Dentler, W L; Borchardt, R T (2001): „VEGF increases BMEC monolayer permeability by affecting occludin expression and tight junction assembly“. In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. 280 (1), S. H434–440.
- Wang, Yu; Bian, Zong-Mei; Yu, Wen-Zhen; Yan, Zheng; Chen, Wei-Chih; Li, Xiao-Xin (2010): „Induction of interleukin-8 gene expression and protein secretion by C-reactive protein in ARPE-19 cells“. In: *Experimental Eye Research*. 91 (2), S. 135–142.
- Webb, N J; Bottomley, M J; Watson, C J; Brenchley, P E (1998): „Vascular endothelial growth factor (VEGF) is released from platelets during blood clotting: implications for measurement of circulating VEGF levels in clinical disease“. In: *Clinical Science (London, England: 1979)*. 94 (4), S. 395–404.
- Weismann, David; Hartvigsen, Karsten; Lauer, Nadine; Bennett, Keiryn L; Scholl, Hendrik P N; Charbel Issa, Peter; Cano, Marisol; Brandstätter, Hubert; u. a. (2011): „Complement factor H binds malondialdehyde epitopes and protects from oxidative stress“. In: *Nature*. 478 (7367), S. 76–81.
- Wu, Kathy H. C.; Tan, Ava Grace; Rochtchina, Elena; Favaloro, Emmanuel J.; Williams, Andrew; Mitchell, Paul; Wang, Jie Jin (2007): „Circulating Inflammatory Markers and Hemostatic Factors in Age-Related Maculopathy: A Population-Based Case–Control Study“. In: *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 48 (5), S. 1983 –1988.
- Wu, Wen-Chuan; Hu, Dan-Ning; Gao, Hua-Xin; Chen, Min; Wang, Dawei; Rosen, Richard; McCormick, Steven A (2010): „Subtoxic levels hydrogen peroxide-induced production

- of interleukin-6 by retinal pigment epithelial cells“. In: *Molecular Vision*. 16 , S. 1864–1873.
- Wynendaele, W; Derua, R; Hoylaerts, M F; Pawinski, A; Waelkens, E; de Bruijn, E A; Paridaens, R; Merlevede, W; u. a. (1999): „Vascular endothelial growth factor measured in platelet poor plasma allows optimal separation between cancer patients and volunteers: a key to study an angiogenic marker in vivo?“. In: *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 10 (8), S. 965–971.
- Xie, Liangqi; Chang, Lina; Guan, Youfei; Wang, Xian (2005): „C-reactive protein augments interleukin-8 secretion in human peripheral blood monocytes“. In: *Journal of cardiovascular pharmacology*. 46 (5), S. 690–696.
- Yamada, Motoko; Kim, Shokei; Egashira, Kensuke; Takeya, Motohiro; Ikeda, Tomohiro; Mimura, Osamu; Iwao, Hiroshi (2003): „Molecular mechanism and role of endothelial monocyte chemoattractant protein-1 induction by vascular endothelial growth factor“. In: *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 23 (11), S. 1996–2001.
- Yang, Dongli; Elner, Susan G; Chen, Xun; Field, Matthew G; Petty, Howard R; Elner, Victor M (2011): „MCP-1-activated monocytes induce apoptosis in human retinal pigment epithelium“. In: *Investigative ophthalmology & visual science*. 52 (8), S. 6026–6034.
- Yoshida, A; Yoshida, S; Hata, Y; Khalil, A K; Ishibashi, T; Inomata, H (1998): „The role of NF-kappaB in retinal neovascularization in the rat. Possible involvement of cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC), a member of the interleukin-8 family“. In: *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society*. 46 (4), S. 429–436.
- Yoshida, Ayako; Elner, Susan G; Bian, Zong-Mei; Kindezelskii, Andrei L; Petty, Howard R; Elner, Victor M (2003): „Activated monocytes induce human retinal pigment epithelial cell apoptosis through caspase-3 activation“. In: *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 83 (8), S. 1117–1129.
- Young, R W; Bok, D (1970): „Autoradiographic studies on the metabolism of the retinal pigment epithelium“. In: *Investigative ophthalmology*. 9 (7), S. 524–536.
- Zamiri, Parisa; Sugita, Sunao; Streilein, J Wayne (2007): „Immunosuppressive properties of the pigmented epithelial cells and the subretinal space“. In: *Chemical Immunology and Allergy*. 92 , S. 86–93.
- Zehetner, Claus; Kirchmair, Rudolf; Huber, Stefan; Kralinger, Martina T; Kieselbach, Gerhard F (2013): „Plasma levels of vascular endothelial growth factor before and after intravitreal injection of bevacizumab, ranibizumab and pegaptanib in patients with age-related macular degeneration, and in patients with diabetic macular oedema“. In: *The British journal of ophthalmology*., DOI: 10.1136/bjophthalmol-2012-302451.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Detektionslimit der Analyte.....	18
Tabelle 2: Vergleich der Zytokinspiegel in der Vorderkammerflüssigkeit bei den AMD-Patienten und der Kontrollgruppe	28
Tabelle 3: Vergleich der Zytokinspiegel im Plasma bei den AMD-Patienten und der Kontrollgruppe	32

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Überblick über das Analyseprotokoll mit der Luminex [®] -Technologie.....	17
Abbildung 2: VEGF in pg/ml in der Vorderkammerflüssigkeit eines Patienten	23
Abbildung 3: VEGF-Status in der Vorderkammer eines Patienten in Abhängigkeit von der Zeit nach intravitrealer Ranibizumab-Injektion.....	24
Abbildung 4: VEGF-Werte in der Vorderkammer eines Patienten mit und ohne Suppression in Abhängigkeit von der Zeit nach intravitrealer Ranibizumab-Injektion	25
Abbildung 5: Stapelbalkendiagramm für den Prozentanteil der AMD-Patienten mit VEGF-Werten oberhalb und unterhalb des Detektionslimits für Tag 25 bis 100 nach intravitrealer Ranibizumab-Injektion.....	26
Abbildung 6: Zytokinlevel in pg/ml in der Vorderkammerflüssigkeit bei den DME-Patienten und der Kontrollgruppe	34
Abbildung 7: VEGF in pg/ml in der Vorderkammerflüssigkeit eines Patienten mit DME.....	35
Abbildung 8: VEGF-Status in der Vorderkammer eines Patienten in Abhängigkeit von der Zeit nach intravitrealer Ranibizumab-Injektion.....	36
Abbildung 9: VEGF-Werte in der Vorderkammer eines Patienten mit und ohne Suppression in Abhängigkeit von der Zeit nach intravitrealer Ranibizumab-Injektion	37
Abbildung 10: Stapelbalkendiagramm für den Prozentanteil der DME-Patienten mit VEGF-Werten oberhalb oder unterhalb des Detektionslimits für Tag 25 bis 216 nach intravitrealer Ranibizumab-Injektion.....	38

Erklärung zur Vorabveröffentlichung von Ergebnissen

Teile der Ergebnisse dieser Arbeit wurden bereits publiziert.

Muether PS, Hermann MM, Viebahn U, Kirchhof B, Fauser S

Vascular endothelial growth factor in patients with exudative age-related macular degeneration treated with ranibizumab

Ophthalmology. 2012 Oct; 119(10):2082-6. doi: 10.1016/j.optha.2012.07.041. Epub 2012 Aug 22.

Weitere Veröffentlichungen der Autorin:

Droege KM, Muether PS, Hermann MM, Caramoy A, Viebahn U, Kirchhof B, Fauser S
Adherence to ranibizumab treatment for neovascular age-related macular degeneration in real life

Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2013 May; 251(5):1281-4. doi: 10.1007/s00417-012-2177-3. Epub 2012 Oct 20.

Danksagung

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich bei allen, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt hierbei:

- Herrn Professor Dr. med. vet. Dr. rer. medic. Stefan Arnhold für die Übernahme der Doktorvaterschaft und für seine professionelle Betreuung, ohne die mein Promotionsvorhaben nicht hätte verwirklicht werden können.
- Herrn Professor Dr. med. Sascha Fauser für die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas und die äußerst kompetente Betreuung und freundliche Unterstützung.
- Herrn PD Dr. med. Philipp Mütter für sein Engagement, die gute Zusammenarbeit, seinen persönlichen Einsatz und für die interessanten Gespräche.
- Dem gesamten Studienteam für die herzliche Aufnahme und die exzellente Arbeitsatmosphäre.
- Allen ÄrztInnen und MitarbeiterInnen des Zentrums für Augenheilkunde der Universitätsklinik Köln, insbesondere:
Susanne Nelles, Erica Menrath, Katharina Dröge, Dr. med. Albert Caramoy, Dr. med. Robert Hörster, Rodica Maniu, Martina Becker, Dr. Sarah Vierkotten, Katharina Thier, Vasilena Sitnilska, Victoria Schwabecker, PD. Dr. med. Manuel Hermann, Monika Odenthal und Doris Braune für die fachliche aber auch persönliche Unterstützung.
- Der Retinovit-Stiftung für die Bereitstellung eines Stipendiums.
- Meinen Eltern Dr. med Ingrid und Rainer Viebahn, M. div. und meinen Schwestern Prof. Dr. rer. nat. Susanne Viebahn und Dr. Cornelia Viebahn, PhD für ihre stets liebevolle, professionelle und kontinuierliche persönliche Unterstützung und Hilfe, für ihre konstruktive Kritik und die vielen Motivationshilfen sowie unserer Labidame Molly für die Verschaffung von Abwechslung und Ausgleich zur Arbeit in Form von Spazier- und Spielstunden. Schließlich unserer geliebten Labradordame Laika, ohne die ich heute hier nicht stehen würde.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6096-1



Photos cover: © Eye: Wolfgang Zwanzger + © molekuul.be - Fotolia.com